Aus dem Physiologischen Institut
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

# EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZU ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN DER LASER-DOPPLER-SPEKTROSKOPIE NACHWEIS IMMUNOLOGISCHER REAKTIONEN BEI ALBUMIN, MYOSIN, DIGITOXIN UND CHORIONGONADOTROPIN SOWIE BEI DEREN ANTISEREN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Stefan Holzmann
aus Frankfurt am Main

~~1982~~
1983

Aus dem Physiologischen Institut.
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

# EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZU ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN DER LASER-DOPPLER-SPEKTROSKOPIE NACHWEIS IMMUNOLOGISCHER REAKTIONEN BEI ALBUMIN, MYOSIN, DIGITOXIN UND CHORIONGONADOTROPIN SOWIE BEI DEREN ANTISEREN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Stefan Holzmann
aus Frankfurt am Main
1982

"Gedruckt mit Genehmigumg der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf"

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. H. Brüster

Referent
gez.: Priv.-Doz. Dr. R. Steiner

Korreferent
gez.: Prof. Dr. J. Morgenstern

INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | EINLEITUNG | 1 |
| 2. | METHODEN | 3 |
| 2.1 | Theoretische Grundlagen der Laser-Doppler-Spektroskopie | 3 |
| 2.1.1 | Streugeometrie | 4 |
| 2.1.2 | Definition des Streuvolumens | 4 |
| 2.1.3 | Definition des Wellenvektors K | 5 |
| 2.1.4 | Homodyne und heterodyne Meßtechnik | 7 |
| 2.1.5 | Autokorrelationsfunktion (ACF) | 7 |
| 2.1.6 | Leistungsdichtespektrum ("power"-Spektrum) und Diffusionskonstante D | 9 |
| 2.1.7 | Gerichtete Bewegung | 14 |
| 2.1.8 | Elektrophorese | 14 |
| 2.2 | Beschichtungsverfahren bei Latexteilchen | 18 |
| 2.2.1 | Beschichtung mit Rinder-Serum Albumin (BSA) | 19 |
| 2.2.2 | Beschichtung mit Human-Serum-Albumin (HSA) | 23 |
| 2.2.3 | Beschichtung mit BSA-Digitoxin-Konjugat | 24 |
| 2.2.4 | Beschichtung mit Antiserum gegen BSA-Digitoxin-Konjugat | 25 |
| 2.2.5 | Beschichtung mit Antiserum gegen Human-Chorion-Gonadotropin (HCG) | 27 |
| 2.2.6 | Beschichtung mit unspezifischem menschlichem Kontrollserum | 27 |
| 2.2.7 | Ergebnisse | 27 |
| 2.2.8 | Diskussion | 29 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 2.3 | Beschreibung eines Meßplatzes für die Laser-Doppler-Spektroskopie | 34 |
| 2.3.1 | Mechanischer Teil | 34 |
| 2.3.2 | Optischer Teil | 35 |
| 2.3.3 | Elektronischer Teil | 35 |
| 2.4 | Meßzellen | 36 |
| 2.4.1 | Meßzellen für Diffusionsmessungen | 36 |
| 2.4.2 | Meßzellen für Elektrophoresemessungen | 36 |
| 2.5 | Beschichtung der Meßkapillaren | 39 |
| 3. | EXPERIMENTELLER TEIL | 40 |
| 3.1 | Albumin-Immuno-Assay | 41 |
| 3.1.1 | Latex-Diffusions-Test mit Rinder-Serum-Albumin (BSA) | 42 |
| 3.1.1.1 | Einfluß der Latexkonzentration und verschiedener Puffermedien auf die Diffusionskonstante D | 42 |
| 3.1.1.2 | BSA-Immuno-Assay | 45 |
| 3.1.2 | Latex-Diffuions-Test mit Human-Serum-Albumin (HSA) | 48 |
| 3.1.2.1 | Einfluß verschiedener Versuchsbedingungen auf die Diffusionskonstante D | 48 |
| 3.1.2.2 | HSA-Immuno-Assay | 50 |
| 3.1.3 | Latex-Elektrophorese-Test mit Human-Serum-Albumin (HSA) | 53 |
| 3.1.4 | Ergebnisse und Diskussion | 56 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 3.2 | Latex-Doppler-Test für Digitoxin | 63 |
| 3.2.1 | Latex-Elektrophorese-Test Antikörper-Nachweis | 63 |
| 3.2.2 | Latex-Elektrophorese-Test BSA-Digitoxin-Nachweis | 66 |
| 3.2.3 | Latex-Elektrophorese-Test Digitoxin-Nachweis | 67 |
| 3.2.4 | Erythrozyten-Test mit Digitoxin | 68 |
| 3.2.4.1 | Beschichtung von Erythrozyten mit Antiserum gegen BSA-Digitoxin-Konjugat | 69 |
| 3.2.4.2 | Erythrozyten-Elektrophorese-Test mit Digitoxin | 69 |
| 3.2.4.3 | Erythorzyten-Diffusions-Test mit Digitoxin | 70 |
| 3.2.5 | Digitoxin-Diffusions-Test ohne Carrier-Teilchen Digitoxin-Nachweis | 70 |
| 3.2.6 | Ergebnisse und Diskussion | 72 |
| 3.3 | Myosin-Immuno-Assay | 77 |
| 3.3.1 | Myosingewinnung | 77 |
| 3.3.2 | Herstellung von Antiserum gegen Myosin | 77 |
| 3.3.3 | Myosin-Diffusions-Test Myosin-Nachweis | 78 |
| 3.3.4 | Myosin-Diffusions-Test Antiserum-Nachweis | 80 |
| 3.3.5 | Ergebnisse und Diskussion | 80 |
| 3.4 | HCG-Immuno-Assay | 85 |
| 3.4.1 | Latex-Elektrophorese-Test HCG-Nachweis in verschiedenen Puffermedien | 86 |

Seite

3.4.2 Latex-Elektrophorese-Test HCG-Nachweis in Urin 87

3.4.3 Latex-Diffusions-Test HCG-Nachweis in Urin 87

3.4.4 Ergebnisse und Diskussion 90

4. ANHANG

4.1 Literaturverzeichnis 96

4.2 Abkürzungen 103

## 1. EINLEITUNG

Mit der Laser-Dopppler-Spektroskopie - einer relativ jungen Meßtechnik - eröffnen sich neue, z. T. vielversprechende Bestimmungsmethoden und Testmöglichkeiten im Bereich biologischer und medizinischer Forschung.

So lassen sich beispielsweise das Molekulargewicht und die Größe nicht nur von globulären Proteinen bestimmen sondern auch von größeren Teilchen - wie Latexkügelchen, Zellen und Viren. Die Messung beruht auf der Analyse des Doppler-verbreiterten Laserstreulichts von den streuenden Teilchen.

Ein anderes Anwendungsgebiet umfaßt z. B. die Bestimmung der Beweglichkeit (Motilität) von Mikroorganismen. Besonders erfolgreich läßt sich deshalb dieses Verfahren in der andrologischen Fertilitätsdiagnostik anwenden, bei der mit der herkömmlichen Beurteilung von Spermaproben unter dem Lichtmikroskop viele subjektive Kriterien in die Bewertung eingehen. Die Laser-Doppler-Spektroskopie liefert hier mit der objektiven Bestimmung der Motilität sowie der mittleren Geschwindigkeit der Spermatozoen wichtige Parameter zur Beurteilung der Fertilität.

Weiterhin kann die Laser-Doppler-Spektroskopie genutzt werden, sehr schnell und präzise die elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten von diversen Blutzellen Lymphozyten, Erythrozythen, Makrophagen - zu messen. Änderungen der Ladungszustände der Membran solcher Zellen bedingen eine Änderung der elektrophoretischen Mobilität, die sehr empfindlich gemessen werden kann. Diese Methode dient auch als Basis für verschiedene Testverfahren.

Da die Laser-Doppler-Spektroskopie die gesamte Dynamik eines Systems in wäßriger Lösung erfaßt, ist diese Methode geeignet, Antigen-Antikörperreaktionen nachzuweisen, und zwar in einem Konzentrationsbereich von etwa 1 ng/ml bis 1 mg/ml.

Wichtige Vorarbeiten zu diesem Thema leisteten - neben der Entwicklung der physikalischen Voraussetzungen - G. und N. Dezelic (21 + 22), Raj und Flygare (54), Cohen und Benedek (15), Mohan, Steiner und Kaufmann (47) sowie Uzgiris (69), um nur einige Autoren zu nennen.

Als Modelle für die Antigen-Antikörper-Reaktionen, die in dieser Arbeit beschrieben sind, dienten folgende Immunsysteme:

1. BSA - Antiserum gegen BSA
2. HSA - Antiserum gegen HSA
3. BSA-Digitoxin-Konjugat - Antiserum gegen BSA-Digitoxin-Konjugat
4. HCG - Antiserum gegen HCG
5. Myosin - Antiserum gegen Myosin

Die Proteine wurden teils mit, teils ohne "carrier"-Partikel (Latexteilchen, Erythrozyten) im Versuch getestet. Die Messungen erfolgten nach zwei unterschiedlichen Methoden, die in den Kapiteln 2 und 3 näher erläutert sind:

1. Laser-Diffusions-Test
   durch Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D

2. Laser-Elektrophorese-Test
   durch Bestimmung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld

# 2. METHODEN

## 2.1 THEORETISCHE GRUNDLAGEN DER LASER-DOPPLER-SPEKTROSKOPIE

Es es ist nicht Aufgabe des theoretischen Teils dieser Arbeit, die gesamten mathematisch-physikalischen Grundlagen und Ableitungen der Laser-Doppler-Spektroskopie zu wiederholen. Dies wurde an anderer Stelle schon ausführlich getan. Vielmehr sollen die wichtigsten Gleichungen und Zusammenhänge noch einmal kurz aufgezeigt und dargestellt werden.

Derjenige Leser, der an einer ausführlichen mathematisch-theoretischen Begründung der LDS interessiert ist, sei auf die entsprechenden Literaturstellen verwiesen (1, 36, 51, 63).

Bewegt sich ein Teilchen im Laserstrahl, dann ist durch den optischen Dopplereffekt das Streulicht in seiner Frequenz gegenüber dem einfallenden Laserlicht leicht verschoben (1 Hz - 1 kHz). Diese Frequenzverschiebung ist mit keinem herkömmlichen Spektrometer direkt zu messen. Erst durch die homodyne bzw. heterodyne Lichtschwebungstechnik, die von Cummins et al. 1964 zum ersten Mal erfolgreich angewandt wurde, wird diese geringe Frequenzverschiebung meßbar. Dabei überlagert man auf dem Photodetektor dem frequenzverschobenen Streulicht noch Laserlicht der Originalfrequenz. Dadurch tritt eine Intensitätsschwebung auf, deren Frequenz der Frequenzverschiebung des Streulichts entspricht und somit vom Detektor gemessen werden kann.

Mit dieser Technik lassen sich Diffusionsbewegungen messen, die direkt mit der Größe der streuenden Teilchen korrelieren und auch gerichtete Bewegungen wie z.B. bei der Elektrophorese können analysiert werden.

2.1.1 STREUGEOMETRIE

2.1.2 DEFINITION DES STREUVOLUMENS, DER KOHÄRENZFLÄCHE UND DES KOHÄRENZ-RAUMWINKELS

Als Voraussetzung für die Durchführung von Versuchen mit Hilfe der Laser-Doppler-Spektroskopie benötigt man einen Laser, der kohärentes, phasengleiches Licht aussendet (mono-mode Laser). Dieser Laserstrahl läßt sich durch eine Linse auf ein streuendes Medium fokussieren. Der Querschnitt a des fokussierten Strahls und eine definierte Zone um diesen Querschnitt a mit der Länge L legen das sog. Streuvolumen fest. Die Werte für a und L errechnen sich nach Steiner (63, S. 16 f) als

Gl. 1 $$a = \frac{4\,f}{\pi\,d} \times h_o$$ und

Gl. 2 $$L = \frac{8\,f^2}{\pi^2 d^2} \times h_o$$

Dabei bedeuten d den Strahlendurchmesser der fokussierenden Linse und $h_o$ die Wellenlänge des Laserlichts. Für einen He-Ne-Laser mit $h_o$ = 632,8 nm ergeben sich für a typische Werte zwischen 50 und 100 um und für L von einigen Millimetern.

Im Abstand R zum Streuvolumen ist eine Detektorfläche unter dem Streuwinkel Θ aufgestellt. Die auf ihr abgebildete Fläche des Streuvolumens, in der keine Phasenverschiebung größer $\pi/2$ auftritt, wird als Kohärenzfläche bezeichnet. Sie errechnet sich als (63, S. 18)

Gl. 3 $$A_{Coh} \approx \frac{h_o^2 R^2}{a L}$$

$h_o^2/aL$ wird auch als Kohärenz-Raumwinkel $\Omega_{Coh}$ bezeichnet. Die Kohärenzfläche ist eine Funktion des Streuwinkels Θ.

Für große Streuwinkel Θ zwischen $60^o$ und $120^o$ ist die Streulichtintensität umgekehrt proportional zu a, für sehr große und sehr kleine Winkel - Θ kleiner $20^o$und Θ größer $130^o$- ist sie umgekehrt proportional zu $a^2$ (63, S. 16).

Das bedeutet für das zweite Beispiel bei gleichbleibender Lichtleistung des Lasers eine größere Intensität des Streulichtes. Dies ist für Experimente mit kleinen Molekülen oder Lösungen mit geringen Konzentrationen an streuenden Teilchen ein wichtiger Faktor.

### 2.1.3. DEFINITION DES WELLENVEKTORS $\bar{K}$

Das von einem Teilchen gestreute Laserlicht der Wellenlänge $h_o$ erfährt durch den Streuprozeß eine Phasenverschiebung, die sich aus dem Vektor des einfallenden Laserstrahls $\bar{K}_o$ und dem Vektor des Streulichtes $\bar{K}_s$ konstruieren läßt (61, S. 13 ff). Es gilt die Beziehung

Gl. 4 $$\bar{K} = \bar{K}_s - \bar{K}_o$$

Der Absolutbetrag von $\bar{K}$ lautet:

Gl. 5 $$|\bar{K}| = \frac{4\pi n}{h_o} \times \sin \Theta/2$$

Dabei bedeutet n den Brechungsindex des streuenden Mediums, $h_o$ die Wellenlänge des einfallenden Laserlichts und $\Theta$ den Winkel, unter dem das Streulicht gemessen wird.

Der Wellenvektor ist also in erster Linie eine Funktion des Meßwinkels und abhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lasers. Grundsätzlich können nur Geschwindigkeitskomponenten in Richtung des Wellenvektors $\bar{K}$ der jeweiligen Versuchsanordnung gemessen werden, da die Dopplerverschiebung $\omega_D = \bar{K} \times \bar{v}$ ist.

## 2.1.4 HOMODYNE UND HETERODYNE MESSTECHNIK

Bei der Laser-Doppler-Spektroskopie gibt es zwei verschiedene Meßtechniken:

1. die homodyne Technik und
2. die heterodyne Technik.

Bei der homodynen Technik überlagern sich die Wellen des gestreuten Lichtes mit sich selbst. Dadurch entstehen an der Kathode des Photomultipliers Überlagerungen, die zu charakteristischen Schwebungssignalen führen. Ein entsprechendes Beispiel ist in Abb. 1 A dargestellt.

Bei der heterodynen Technik benutzt man ein Referenzsignal - nicht frequenzverschobenes Laserlicht - das auf dem Photomultiplier mit dem Streulicht gemischt wird. Beide Techniken werden für unterschiedliche Meßsituationen verwendet. Auf den Anwendungsbereich der jeweiligen Methode wird später nochmals ausführlicher eingegangen.

## 2.1.5 AUTOKORRELATIONSFUNKTION (ACF)

Die Auswertung der gemessenen Streulichtwerte erfolgt - sowohl bei der heterodynen als auch bei der homodynen Methode - über die Autokorrelationsfunktion (ACF). Die ACF bietet eine schnelle und exakte Möglichkeit, den Grad der Korrelation dynamischer Vorgänge innerhalb eines definierten Zeitintervalls zu bestimmen.

Sie beinhaltet die gesamte Information über die Dynamik eines zu untersuchenden Systems und ist daher ausgezeichnet zur Signalanalyse bei der Laser-Doppler-Spektroskopie geeignet.

Zur Auswertung wird das Stromsignal des Photomultipliers entsprechend der Intensität des Streulichts als fluktuierendes Analogsignal dargestellt, dessen Amplitude direkt korreliert werden kann (Analogverfahren).
In Abb. 1 A ist ein entsprechendes schwankendes Analogsignal der Amplitude A (t) dargestellt. Das Signal schwankt um einen Mittelwert $< A >$, der unabhängig von der Zeit gleich Null betragen soll. Die Autokorrelationsfunktion läßt sich ausdrücken als Integraldarstellung:

Gl. 6 $$ACF = < A(o)\ A(t) > = \lim_{T \to \infty} \frac{1}{T} \int_{0}^{T} A(t)\ A(t + \tau)\, dt$$

oder als Summenschreibweise

Gl. 7 $$ACF = < A(o)\ A(\tau) > = \lim \frac{1}{N} \sum_{j=1}^{N} A_j\ A_j + n$$

Die Taktzeit des Korrelators beträgt $\Delta t$, und entsprechend dem Zeitintervall, das in die ACF einbezogen wird, ergibt sich bei n Speicherplätzen (Kanälen) des Korrelators (63, S 27; Abb. 1)

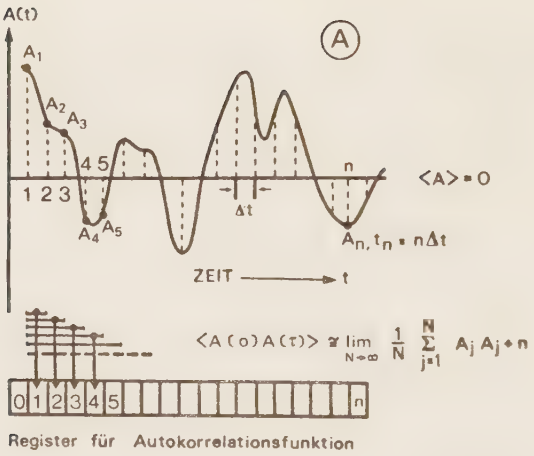
Gl. 8 $$\tau_{max.} = n \times \Delta t$$

Anhand der Gl. 7 läßt sich die ACF relativ leicht beschreiben. Sie wird in n diskrete Werte mit dem zeitlichen Abstand $\Delta t$ zerlegt. Für n = 0 ergibt sich der Wert $\langle A^2 \rangle$ . Da dieser Anfangswert sich aus der Summe von Quadraten zusammensetzt, die alle einen positiven Wert besitzen und zudem den höchstmöglichen Korrelationsgrad aufweisen, ist dieser Wert auch der Maximalwert einer ACF. Die nachfolgenden Werte ergeben sich als Summation von Produkten aus entsprechenden Amplitudenwerten, die jeweils ein Vielfaches von $\Delta t$ auseinanderliegen. Auch ein Vorzeichenwechsel kann auftreten, so daß sich einzelne Werte kompensieren. Da mit wachsendem zeitlichen Abstand zweier Amplituden- werte der Korrelationsgrad abnimmt, stellt die ACF eine fallende Funktion dar, die einem zeitlichen Mittelwert der Amplitude $\langle A \rangle^2$ zustrebt, der entweder Null sein kann (wenn der Gleichspannungsanteil weggefiltert wurde) oder der einen konstanten zeitunabhängigen Mittelwert annehmen kann. Für den speziellen Fall der Diffusion ergibt sich für die ACF eine monoton fallende Exponentialfunktion (Abb. 1 B), deren Halbwertsbreite $\tau_A$ ein Maß für die Diffusionskontante D darstellt.

### 2.1.6 LEISTUNGSDICHTESPEKTRUM ("POWER"-SPEKTRUM) UND DIFFUSIONSKONSTANTE D

Verwendet man anstelle eines Autokorrelators einen Frequenzanalysator für die Auswertung des Streulichtes, so erhält man ein Leistungsdichtespektrum. Dieses Leistungsdichtespektrum, das auch "power"-Spektrum genannt wird, ist durch das Wiener-Khintchine-Theorem mit der ACF durch einfache Fouriertransformation verknüpft:

Gl. 9 $$S_i(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-i\omega t} C_i(\tau)\, dt$$



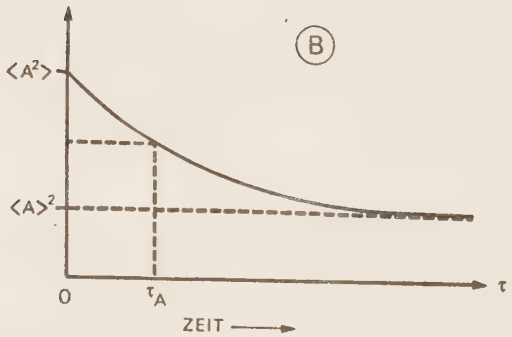




Abb. 1: Fluktuierendes Analogsignal $A_{(t)}$ eines Photodetektors durch Streulicht von diffundierenden Latexteilchen oder Makromolekülen in Lösung hervorgerufen (A).
Die zugehörige Autokorrelationsfunktion ist in diesem Fall eine monoton fallende Exponentialfunktion (B).

Dabei bedeutet $C_i$ den Term für die Autokorrelationsfunktion. Setzt man für $C_i$ wieder eine Exponentialfunktion der Form

Gl. 10 $$g_{(\tau)} = e^{i\omega_o t}\, e^{-\tau/\tau_c}$$

dann erhält man für das "power"-Spektrum bei der homodynen Meßtechnik einen Term der Form

Gl.11 $$S_i^{homo}(\omega)_{\omega \geq 0} = k_1 + k_2 + \frac{2}{\pi} \langle i \rangle^2 \frac{2\Gamma}{\omega^2 + (2\Gamma)^2}$$

mit

Gl. 12 $$\Gamma = 1/\tau_c$$

und für die heterodyne Methode ergibt sich

Gl. 13 $$S_i^{het}(\omega)_{\omega \geq 0} = k_3 + k_4 + \frac{4}{\pi} i_{LO} \langle i_S \rangle \frac{\Gamma}{\omega^2 + \Gamma^2}$$

Die Verlaufsform beider Gleichungen wird durch eine Lorentz-Linie beschrieben. Dabei zeigt sich, daß diese Lorentz-Linie bei der homodynen Methode genau um den Faktor 2 breiter ist als bei der heterodynen Technik. Außerdem verbessert sich das Signal/Rausch-Verhältnis zugunsten der heterodynen Methode um den Faktor 4 (63, S. 31).

Bei den o.g. Gleichungen bedeutet $\tau_c$ die Relaxationszeit oder auch Korrelationszeit, die den Abfall der Amplitude auf den Wert 1/e darstellt, $k_1$ und $k_3$ beschreiben ein frequenzunabhängiges "weißes" Rauschen, $k_2$ und $k_4$ stellen die Gleichstromkomponente dar, $i_{LO}$ den Photostrom, der nur von lokalen Streuern verursacht wird und $\langle i_S \rangle$ den mittleren Photostrom des Streulichts.

Wird nun nicht - wie in den Gl. 11 und 13 - das elektrische Feld, sondern der Detektorstrom korreliert, und berücksichtigt man, daß die Korrelationszeit $\tau_c$ vom Diffisionskoeffizienten D und dem Quadrat des Wellenvektors $\bar{K}$ abhängt,

Gl. 14 $$1/\tau_c = \Gamma = DK^2$$

(63, S. 32 ff) so ergeben sich für die entsprechenden "power"-Spektren folgende Gleichungen:

1. homodyning

Gl. 15 $$S_i^{homo}(\omega) = k_5 + k_6 + \frac{\langle i_S \rangle^2}{\pi} \times \frac{2\,DK^2}{\omega^2 + (2\,DK^2)^2}$$

2. heterodyning

G. 16 $$S_i^{het}(\omega) = k_7 + k_8 + \frac{4\,i_{LO}\langle i_S \rangle}{\pi} \times \frac{DK^2}{\omega^2 + (DK^2)^2}$$

Die Konstanten $k_5$ bis $k_8$ gleichen den Konstanten $k_1$ bis $k_4$. Die letzten Terme stellen wiederum Lorentz-Linien dar, die für die homodyne Technik eine halbe Halbwertsbreite von 2 $DK^2$ und für die heterodyne Technik eine von 1 $DK^2$ ergeben. Daraus lassen sich die Diffusionskoeffizienten wie folgt bestimmen:

Gl. 17 $$2\pi \times \Delta\gamma_{1/2} = \Delta\omega_{1/2} = 2\ DK^2$$

und

Gl. 18 $$2\pi \times \Delta\gamma_{1/2} = \Delta\omega_{1/2} = 1\ DK^2$$

$\gamma$ 1/2 bedeutet die Quantenbausbeute des Photomultipliers. Auch hier zeigt sich ein Unterschied der Halbwertsbreiten beider Lorentz-Linien vom Faktor 2. Berechnet man den Diffusionskoeffizienten D nun nicht aus dem "power"-Spektrum, sondern aus der zugehörigen ACF ( Abb. 1 B), so ergibt sich aus

Gl. 19 $$I = \frac{\langle A^2 \rangle}{2}$$

und

Gl. 20 $$I = \langle A^2 \rangle \times e^{-2\ DK^2 \tau_A}$$

für homodyning folgender Ausdruck:

Gl. 21 $$\ln \frac{\langle A^2 \rangle}{1/2 \langle A^2 \rangle} = 2\ DK^2 \times \tau_A$$

Daraus folgt

Gl. 22 $$\ln 2 = 2\ DK^2 \times \tau_A$$

Unmittelbar ergibt sich daraus

Gl. 23 $$D_{homo} = \frac{\ln 2}{2\ K^2 \times \tau_A}$$

Für die heterodyne Methode ergibt sich entsprechend

Gl. 24 $$D_{het} = \frac{\ln 2}{K^2 \times \tau_A}$$

Bei allen im folgenden Kapitel beschriebenen Versuchen zur Diffusionsmessung wird die in den Gl. 23 bzw. 24 vorkommende Halbwertszeit $\tau_A$ experimentell bestimmt und anschließend die Diffusionskonstande D berechnet.

Alle vorgenannten mathematischen Beziehungen gelten in dieser Form nur für sphärische Streuer. Für elliptische oder zylindrische Teilchen gelten abgewandelte Bedingungen (63, S. 36 ff. und die dort angegebene Lit.), auf die hier nicht näher eingegangen werden kann.

## 2.1.7 GERICHTETE BEWEGUNG

Die Laser-Doppler-Spektroskopie ist über die Messung und Bestimmung von Diffusionskoeffizienten hinaus auch zur Beschreibung von gerichteten Bewegungen geeignet. Unter gerichteter Bewegung versteht man die Beweglichkeit von Teilchen, Zellen, Molekülen o.a. unter dem Einfluß äußerer Kräfte wie elektrischer Felder, statischer Druck- unterschiede (Strömungen), Chemotaxis sowie gerichteter Eigenbewegungen großer Viren und Bakterien.
Bei den folgend beschriebenen Versuchen dieser Arbeit wird unter gerichteter Bewegung lediglich der Aspekt der Elektrophorese, d.h. die Beweglichkeit bzw. Mobilität von Teilchen und Molekülen im elektrischen Feld betrachtet.

## 2.1.8 ELEKTROPHORESE

Bei der Elektrophorese ist nur die heterodyne Meßtechnik zur Anwendung der Laser-Doppler-Spektroskopie geeignet. Die Begründung dieses Phänomens findet sich in den Arbeiten von Ware (70) und Steiner (63, S. 42 f). Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit nur die heterodyne Technik für Beweglichkeitsmessungen im elektrischen Feld angewandt. Die Beschreibung eines entsprechenden Versuchsaufbaus findet sich in den Kap. 2.3 und 2.4.

Wird an eine Lösung mit elektrisch geladenen Teilchen ein elektrisches Feld der Feldstärke E angelegt, dann wandern diese Teilchen entsprechend ihrer Ladung zur entgegengesetzt geladenen Elektrode.

Die Größe dieser Ladungen bestimmt die elektrophoretische Beweglichkeit $\mu$ dieser Teilchen sowie deren Wanderungsgeschwindigkeit $\bar{v}$.

Es gilt die Beziehung:

Gl. 25 $$\bar{v} = \mu \times E$$

Auch bei der gerichteten Bewegung im elektrischen Feld läßt sich die thermische Diffusion, die Brown'sche Molekularbewegung, nicht ausschalten.

Berücksichtigt man diese Tatsache, und berechnet man anschließend das zugehörige "power"-Spektrum, so erhält man einen Term ähnlich der Gl. 16

Gl. 26 $$S_i^{het}(\omega) = k_7 + k_8 + \frac{4\, i_{LO}\, i_S}{\pi} \times \frac{DK^2}{\omega \pm \bar{K}\cdot\bar{v} + (DK^2)}$$

Auch hier stellt das "power"-Spektrum eine Lorentz-Linie dar, die aber nicht wie bei der Diffusion symmetrisch um $\omega = o$ lokalisiert ist, sondern um die Dopplerfrequenz

Gl. 27 $$\omega_D = 2\pi f_D$$

seitlich verschoben ist.

Die Frequenzverschiebung $f_D$ läßt sich mit Hilfe der Gleichung 25 sowie der Beziehung

Gl. 28 $$\omega_D = |\bar{K}| \times |\bar{v}|$$

umformen zu

Gl. 28 $$2\pi f_D = |\bar{K}| \times |\bar{v}|$$

und schließlich zu

Gl. 30 $$f_D = \frac{|\bar{K}| \times \mu \times E}{2}$$

Durch weiteres Umformen und unter Berücksichtigung von

Gl. 5 $$|\bar{K}| = \frac{4\pi n}{h_o} \times \sin \Theta/2$$

läßt sich die elektrophoretische Beweglichkeit $\mu$ (Mobilität) leicht berechnen:

Gl. 29 $$\mu = \frac{f_D \times h_o}{2 E \times n \times \sin \Theta/2}$$

Die elektrophoretische Beweglichkeit $\mu$ ist bei konstantem elektrischen Feld E und bei konstantem Wellenvektor $\bar{K}$ direkt proportional der Frequenzverschiebung $f_D$. Die Frequenz-

verschiebung $f_D$ des "power"-Spektrums wird experimentell bestimmt.

Abb. 2 zeigt ein typisches "power"-Spektrum wie es bei der Elektrophorese von Molekülen und anderen Teilchen aufgezeichnet werden kann. In diesem Fall handelte es sich um beschichtete Latexteilchen, die unter einem Meßwinkel von $\Theta = 30^{\circ}$ und in einem elektrischen Feld der Stärke $E = 50$ V/cm gemessen wurden.

$\mu$ ist ein Maß für die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit $\bar{v}$ (Gl. 25) von Teilchen, Zellen oder Molekülen und somit auch ein Maß für deren Oberflächenladung. Daher lassen sich Änderungen dieser Oberflächenladungen durch chemische Reaktionen (z.B. Immunreaktionen) oder durch Zellwandveränderungen, die mit einer Ladungsumverteilung der Zellmenbran verbunden sind (z.B. gesunde Zellen - Tumorzellen) direkt über den Parameter "Mobilität" problemlos und schnell bestimmen.

Ein weiterer Anwendungsbereich der Laser-Doppler-Spektroskopie liegt in der Analyse komplexer Makromolekülsysteme (Proteinlösungen, Blutplasma, bzw. -serum, u.ä.), bei denen sich die einzelnen Komponenten durch eine unterschiedliche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit bzw. Mobilität unterscheiden. Voraussetzung derartiger Messungen sind inerte Systeme, bei denen weder chemische noch physikalische Interaktionen während der Meßzeit bestehen.

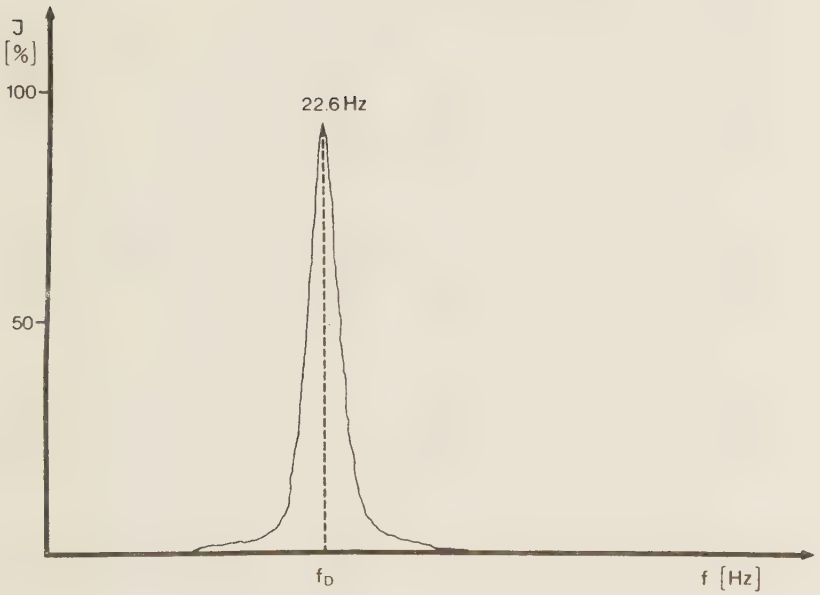



Abb. 2: Typisches "power"-Spektrum wie es bei der Elektrophorese von Makromolekülen und anderen Teilchen aufgezeichnet werden kann. In diesem Fall handelt es sich um beschichtete Latexteilchen, die unter einem Meßwinkel von $\Theta = 30^{\circ}$ und einer elektrischen Feldstärke von E = 50 V/cm gemessen wurden.

## 2.2 BESCHICHTUNGSVERFAHREN BEI LATEXTEILCHEN

Für die Durchführung und den Nachweis von Immunreaktionen mit Hilfe der Laser-Doppler-Spektroskopie ist die Beschichtung von Trägerteilchen mit Proteinen - Antigenen resp. Antikörpern - eine wichtige Voraussetzung.

Da in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben über die Bindungskapazität von Latexteilchen für Proteine publiziert wurden (2, 47, 48, 58) war es notwendig, eigene Untersuchungen zu diesem Thema anzustellen.

Als Versuchsmaterial dienten drei verschiedene Chargen von Latexteilchen der Firma Serva Feinbiochemica, Heidelberg (Tab. 1), die sich durch ihren Durchmesser und die Anzahl der Teilchen pro Volumeneinheit unterschieden.

Die Durchführung der Versuche geschah nach folgendem Prinzip: Zuerst wurden alle drei Chargen der Latexteilchen 1:10 verdünnt, so daß eine 1%ige Latexsuspension entstand, die anschließend gründlich gegen zweifach destilliertes Wasser dialysiert wurde. Durch die Dialyse werden alle Emulgatoren entfernt, die bei der Herstellung der Latexteilchen Verwendung finden (15, 21, 22, 54, 69). Die Dialysedauer sollte mindestens 24 h betragen, um einen ausreichenden Effekt zu erzielen.

Die so hergestellte 1%ige Latexsuspension ist über lange Zeit - nach eigenen Erfahrungen mindestens sechs Monate - stabil, wenn sie bei 4°C aufbewahrt wird. Diese Werte stimmen mit den Untersuchungen anderer Autoren überein, die sogar eine Haltbarkeitsdauer von mehreren Jahren angeben (16).

Tabelle 1

| Chargen-Nr. | Ø der Teilchen $m^{-6}$ | O $cm^2$/part | c part/ml | O ges. $cm^2$/ml | c part/ml | O ges. $cm^2$/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 100 mg/ml ≙ 10 %ige Lösung | | ≙ 10 mg/ml 1 %ige Lösung | |
| 41920 (Control D) | 0,176 ± 0,0023 | $9,73 \times 10^{-10}$ | $2,97 \times 10^{13}$ | 28.900 | $2,97 \times 10^{12}$ | 2.890 |
| 41930 (Control C) | 0,357 ± 0,0056 | $40,04 \times 10^{-10}$ | $3,72 \times 10^{12}$ | 14.900 | $3,72 \times 10^{11}$ | 1.490 |
| 41943 (Control H) | 0,794 ± 0,0043 | $198,1 \times 10^{-10}$ | $3,51 \times 10^{11}$ | 6.950 | $3,51 \times 10^{10}$ | 695 |

Einige physikalische Größen der verwendeten Latexteilchen

O : Oberfläche eines einzelnen Latexteilchens

$O_{ges}$: Oberfläche aller Latexteilchen pro ml Ansatz

c : Anzahl der Latexteilchen pro ml Ansatz

## 2.2.1 BESCHICHTUNG MIT RINDER-SERUM-ALBUMIN (BSA)

Als erstes Protein zur Beschichtung wurde Rinder-Serum-Albumin verwendet. Es handelte sich um ein Produkt der Firma Serva Feinbiochemica, Heidelberg, mit der Chargen-Nr. 11930, Control E. Das Albumin lag vor als Cohn-Fraktion V (Lyophil. rein, 92 % min.), ein nicht sehr reines Albumin, das noch Verunreinigungen - besonders in Form von Globulinen enthält.

Die Konzentration einer Albumin-Stammlösung wurde auf 0,5 % eingestellt. Als Lösungsmittel diente ein Essigsäure-NaOH-Puffer mit einem pH-Wert von 5,4 und einer Ionenstärke von I = 0,005. Diese Lösung ist bei 4°C etwa 1-2 Wochen haltbar.

Für den Beschichtungsvorgang selbst wurden jeweils 0,5 ml 1%ige Latexsuspension plus 1,5 ml 0,5 %ige Albumin-Stammlösung inkubiert; das entspricht einer Verdünnung von 1:4. Die Inkubationszeit betrug 12 h, die Inkubationstemperatur 4°C.

Nach der Inkubation von 12 h wurden die Ansätze dreimal mit einer gekühlten Ultrazentrifuge bei 20.000 g zentrifugiert, um das nicht an Latex gebundene Albumin aus den Proben auszuwaschen. Die Kühlung ist notwendig, um eine Denaturierung des Albumins durch Hitzeeinwirkung zu verhindern.

Die Dauer für den Zentrifugationsvorgang lag bei 30 Minuten für die Teilchen mit einem Durchmesser von d = 0,357 um sowie d = 0,794 um und bei 75 Minuten für die Teilchen mit einem Durchmesser von d = 0,176 um.

Der "Waschvorgang" erfolgte mit einem Tris-HCl-Puffer der Ionenstärke I = 0,005 und einem pH-Wert von 8,6.

Nach jedem "Waschen" wurden die Überstände der Proben vorsichtig abgesaugt und auf ihren Proteingehalt untersucht, um die Bindungskapazität der Latexteilchen für das o.a. Rinder-Serum-Albumin zu ermitteln. Das Sediment wurde jeweils wieder im selben Volumen Puffer Tris-HCl-Puffer gelöst.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Bio-Rad-Methode (3).

Da die Proteinbestimmungen mit dieser neuen Methode für BSA um den Faktor 2,1 zu hoch ausfallen (3, S.4), müssen die empirisch ermittelten Proteinmengen rechnerisch korrigiert werden. Die entsprechenden Werte zeigt Tab. 3.

Bei den Proteinmessungen zeigte sich, daß das Rinder-Serum-Albumin mit den Latexteilchen eine relativ feste Bindung eingeht (s. Kap. 2.2.8.).

Man kann davon ausgehen, daß das nicht ausgewaschene Albumin an die Latexteilchen gebunden ist, da sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Latexteilchen im elektrischen Feld signifikant von der nicht beschichteter Teilchen unterscheidet.

Aus den bekannten Konzentrationen des Rinder-Serum-Albumins vor und nach den "Waschvorgängen" und den bekannten Konzentrationen und Größen der Latexteilchen lassen sich leicht die Bindungskapazitäten der Latexpartikel pro Einheit ihrer Oberfläche berechnen.

Da die Rinder-Serum-Albumin-Stammlösung eine Konzentration von 0,5 % = 5 mg Albumin/ml Lösung besitzt und alle Ansätze im Verhältnis 3:4 (15 Teile Albumin plus 5 Teile Latex) verdünnt werden, resultiert für alle Ansätze eine Albumin-Konzentration von 3,75 mg Albumin pro ml Lösung (Gl. 32)

Gl. 32 $$c_{Alb.} = \frac{3}{4} \times c_o$$

Dabei bedeutet $c_o$ die Konzentration der Albumin-Stammlösung.

Da sich die Latexpartikel sowohl in ihren Durchmessern als auch in ihren Konzentrationen unterscheiden, muß für jede Charge eine gesonderte Berechnung durchgeführt werden. Die aktuellen Konzentrationen für jede Charge lassen sich entsprechend einer Verdünnung von 1:4 (15 Teile Albumin plus 5 Teile Latex), nach Gl. 33 berechnen,

Gl. 33 $$c_{akt.} = \frac{c_L}{4}$$

wobei $c_{akt.}$ die jeweilige Latexkonzentration pro ml Ansatz und $c_L$ die Latexkonzentration einer 1%igen Latexsuspension (siehe Tab. 1) darstellen.

Die jeweiligen aktuellen Konzentrationen nach Gl. 33 für die verschiedenen Chargen von Latexpartikeln zeigt Tab. 3.

Die aktuelle Gesamtoberfläche aller Latexteilchen in $cm^2$ pro Volumeneinheit errechnet sich nach Gl. 34. Die Ergebnisse dieser Berechnungen zeigt Tab. 2.

Tabelle 2

| Ø der Teilchen | Latex-Konzentration $C_{akt.}$ nach Gl. 33 | Latex-Oberfläche $O_{akt.}$ nach Gl. 34 |
|---|---|---|
| um | Teilchen/ml | $cm^2/ml$ |
| 0,176 | $74,25 \times 10^{10}$ | 722,6 |
| 0,357 | $9,30 \times 10^{10}$ | 372,4 |
| 0,794 | $8,78 \times 10^{9}$ | 173,9 |

Latexkonzentration und Latexoberfläche bei der Beschichtung mit Rinder-Serum-Albumin (BSA)

Gl. 34 $$O_{akt.} = 10^{-8} \pi \times d^2 \times c_{akt.} \quad [cm^2]$$

d bedeutet den Teilchendurchmesser in um, $c_{akt.}$ die aus Gl. 33 errechnete Latexkonzentration.

Mißt man nun die Albumin-Konzentration der Überstände nach jedem Zentrifugationsschritt und addiert diese Werte, so erhält man den Anteil des nicht an Latex gebundenen Albumins. Die entsprechenden Ergebnisse finden sich in Tab. 4. Dort ist sowohl die absolute Albumin-Konzentration in ug/ml als auch ihr relativer Anteil, bezogen auf den Ausgangswert von $c_{alb.}$ = 3,75 mg/ml (siehe Gl. 32), angegeben.

Zieht man nun den nicht an Latex gebundenen Anteil des Albumins von der Ausgangskonzentration $c_{alb.}$ = 3,75 mg/ml ab, so erhält man den an Latex gebundenen Anteil des Rinder-Serum-Albumins $c_{geb.}$.

Da der nach der Bio-Rad-Methode gemessene Proteinanteil für reine BSA-Lösungen um den Faktor 2,1 zu hoch gemessen wird (3, S. 4), müssen die gemessenen Proteinmengen noch mit dem Korrekturfaktor k = 1:2,1 multipliziert werden, um den wahren Proteinanteil zu erhalten.

Bezieht man diesen gebundenen Proteinanteil jetzt auf die Latexgesamtoberfläche pro ml Ansatz, so ergibt sich nach Gl. 33 die gesuchte Bindungskapazität der Latexteilchen in ng Albumin pro $cm^2$ Latexoberfläche als

Gl. 35 $$B = 10^3 \, k \times \frac{c_{geb.}}{O_{akt.}} \quad [ng/cm^2]$$

Dabei bedeutet B die Bindungskapazität der Latexteilchen in ng pro $cm^2$, $c_{geb.}$ die an Latex gebundene Albuminmenge in ug, $O_{akt.}$ die aus Gl. 34 errechnete Latexoberfläche pro ml Ansatz und k den oben beschriebenen Korrekturfaktor für Rinder-Serum-Albumin.
Die Messungen ergaben, daß durchschnittlich 394,0 ng BSA pro $cm^2$ Latexoberfläche gebunden wurden (Tab. 3), d.h.
B (BSA) = 394,0 ng/$cm^2$

## 2.2.2 BESCHICHTUNG MIT HUMAN-SERUM-ALBUMIN (HSA)

Als zweites Protein zur Latexbeschichtung diente Human-Serum-Albumin der Firma Behringwerke AG, Marburg/Lahn, (Chargen-Nr. ORHA 20/21).
Das Protein lag vor als kristalline, hochgereinigte Fraktion mit einem elektrophoretischen Reinheitsgrad von 100 %. Das Produkt enthielt laut Hersteller keine meßbaren Verunreinigungen durch andere Proteine.

Die Konzentration der Human-Serum-Albumin-Stammlösung wurde ebenfalls - wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben - auf 0,5 % eingestellt.
Auch die Versuchsbedingungen wie pH-Wert, Ionenstärke, etc. waren identisch mit denjenigen bei Rinder-Serum-Albumin. Die HSA-Stammlösung ist ebenfalls 1-2 Wochen bei 4°C haltbar.

Der Beschichtungsvorgang mit Human-Serum-Albumin entspricht in seiner Durchführung genau demjenigen mit Rinder-Serum-Albumin.

Die Menge des an Latex gebundenen Human-Serum-Albumins und die Bindungskapazitäten der Latexteilchen für HSA zeigt Tab. 4. Die Berechnungen erfolgten nach den Gl. 32 bis 35.

Die durchschnittliche Bindungskapazität der Latexpartikel für Human-Serum-Albumin lag bei B (HSA) = 143,0 ng/cm$^2$.

### 2.2.3 BESCHICHTUNG MIT BSA-DIGITOXIN-KONJUGAT

Als weiteres Protein zur Beschichtung von Latexkügelchen wurde an Rinder-Serum-Albumin gekoppeltes Digitoxin verwendet.

Bei dem Serum-Albumin handelte es sich um eine Charge der Firma Behringwerke AG, Marburg/Lahn, mit der Bezeichnung "Serum-Albumin vom Rind, reinst" (Art.-Nr. 5009 A), beim Digitoxin um ein Präparat der Firma Boehringer, Mannheim (Art.-Nr. 90 104).

Die Herstellung des Albumin-Digitoxin-Konjugates erfolgte nach der bei Peters (52, S. 11 ff.) beschriebenen Methode. Als Lyophilisat soll das Albumin-Digitoxin-Konjugat mindestens 9 Monate haltbar sein (52, S. 13).
Das Beschichtungsverfahren unterschied sich in einigen Punkten von demjenigen mit reinem Rinder-Serum-Albumin:

1) Die Albumin-Digitoxin-Stammlösung hatte eine Konzentration von $c_o$ = 10 mg/ml, das entspricht einer 1,0 %igen Lösung gegenüber einem 0,5 %igen Ansatz beim Rinder-Serum-Albumin.

2) Der Inkubationsansatz enthielt 1,0 ml 1%ige Latexsuspension plus 1,0 ml 1 %ige Albumin-Digitoxin-Lösung, entsprechend einer Verdünnung von 1:2 gegenüber einer Verdünnung von 1:4 beim Rinder-Serum-Albumin. Daraus errechnet sich eine initiale Albumin-Digitoxin-Konzentration von 5 mg pro ml Ansatz und eine initiale Latexkonzentration von

Gl. 36 $$c_{akt.} = \frac{c_L}{2}$$

Dabei bedeutet $c_{akt.}$ die jeweilige Latexmenge pro ml Ansatz und $c_L$ die Latexkonzentration einer 1%igen Latexsuspension (siehe auch Gl. 33 und Tab. 1).

Alle weiteren Versuchsbedingungen entsprachen den unter Punkt 2.2.1 beschriebenen.

Die Berechnung der Bindungskapazitäten erfolgte aus den Gleichungen 34 und 35. Die Ergebnisse dieser Berechnungen zeigt Tab. 5. Die mittlere Bindungskapazität für BSA-Digitoxin betrug B (BSA-Dig.) = 118,8 ng/ml.

### 2.2.4 BESCHICHTUNG MIT ANTISERUM GEGEN BSA-DIGITOXIN-KONJUGAT

Latexteilchen lassen sich nicht nur mit gereinigten Proteinen, sondern auch mit hochtitrigen Antiseren beschichten. Die Methode entspricht im wesentlichen derjenigen bei der Beschichtung mit Proteinen: gründlich gegen aqua bidest. dialysierte Latexteilchen wurden zusammen mit Antiserum und einer Phosphatpufferlösung inkubiert.

Bei dem im folgenden verwendeten Antiserum handelte es sich um eine Charge von Peters (1978), deren Herstellung und Eigenschaften in seiner Habil.-Schrift (52) auf den Seiten 10 bis 22 beschrieben sind.

Bei der Pufferlösung handelte es sich um einen Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von pH = 7,42 und der Ionenstärke I = 0,088.

Der Inkubationsansatz bestand aus 50 ul 1%iger Latexsuspension (s. Tab. 6) plus 200 ul 1:10 verdünntem Antiserum plus 1.000 ul Phosphatpufferlösung. Die Inkubationszeit betrug 12 Stunden, die Inkubationstemperatur 4°C. Anschließend wurden die Latexteilchen dreimal wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben, mit o.a. Puffer gewaschen und nach dem letzten "Waschen" in 1 ml Puffer gelöst.

Die aktuelle Latexkonzentration pro ml Ansatz errechnet sich dann nach Gl. 37 als

Gl. 37 $$c_{akt.} = \frac{1}{20} \times c_L$$

wobei $c_L$ die Konzentration einer 1%igen Latexsuspension darstellt. Die Proteinkonzentration des unverdünnten Antiserums betrug $C_o$ = 69,0 mg/ml, die Konzentration im Inkubationsansatz nach Gl. 38 betrug $c_{akt.\ AS}$ = 11,0 mg/ml Ansatz.

Gl. 38 $$c_{akt.}(AS) = \frac{200}{1250} \times c_o = \frac{4}{25} \times c_o$$

Die Ergebnisse des Beschichtungsverfahrens zeigt Tab. 6. Die mittlere Bindungskapazität betrug $B_{(AS)}$ = 812,9 ng/cm$^2$.

### 2.2.5 BESCHICHTUNG MIT ANTISERUM GEGEN HUMAN-CHORION-GONDATROPIN (HCG)

Die Beschichtung von Latexteilchen mit Antiserum gegen HCG wurde nicht selbst durchgeführt. Es wurden für den Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktionen Latexteilchen aus dem im Handel erhältlichen "Gonavislide-Test" der Firma Dr. Molter GmbH, Heidelberg, verwendet.

### 2.2.6 BESCHICHTUNG MIT UNSPEZIFISCHEM MENSCHLICHEM KONTROLLSERUM

Die Beschichtung mit diesem Kontrollserum entspricht in allen Punkten dem unter Punkt 2.2.4 beschriebenen Verfahren. Die Konzentration des unverdünnten Kontrollserums betrug $c_o$ = 74,5 mg/ml. Daraus ergibt sich nach Gl. 38 eine initiale Protein-Konzentration von $c_{akt.}$ = 1,2 mg/ml im Inkubationsansatz. Die Ergebnisse des Beschichtungsverfahrens finden sich in Tab. 7.
Die mittlere Bindungskapazität betrug $B_{(Serum)}$ = 613,1 ng/cm$^2$ Latexoberfläche.

### 2.2.7 ERGEBNISSE

Bei den vorliegenden Experimenten hat sich gezeigt, daß nach dem ersten Zentrifugationsschritt noch weit über 80 % des initialen Proteinanteils im Überstand zu finden ist. Das gilt sowohl für die "kleinen" Moleküle (Albumine) als auch für die "größeren" (Gamma-Globuline, Antiseren). Das bedeutet, daß weniger als 20 % der ursprünglichen Proteinmengen im Sediment verblieben sind. Löst man dieses wieder im selben Volumen einer Pufferlösung und zentrifugiert erneut, so finden sich im zweiten Überstand nie mehr als 5 % der

initialen Protein-Konzentration und im dritten Überstand sogar nie mehr als 0,2 %. Auch bei weiteren Zentrifugationsschritten überschreitet der ausgewaschene Proteinanteil niemals die Grenze von 0,2 %, oft ist sogar gar kein Protein mehr nachweisbar. Die Werte des gebundenen Proteins liegen zwischen 1,5 und 14,1 % der Ausgangskonzentration, abhängig von der Art des Proteins und der Größe der Latexteilchen.

Man kann davon ausgehen, daß spätestens nach dem dritten Zentrifugieren das gesamte nicht an Latex gebundene Protein ausgewaschen ist und die restlichen Moleküle fest an die Latexteilchen gebunden sind.

Addiert man nun die Protein-Konzentrationen der drei Überstände (s. Tab. 3 bis 7) und zieht diesen Wert von der Ausgangskonzentration ab, so erhält man den an die Latexteilchen gebundenen Anteil der Protein $c_{geb.}$. Dieser muß für Albumin aus methodischen Gründen (3, S. 4) noch mit dem Korrekturfaktor k = 1/2.1 multipliziert werden. Hat man diesen Wert ermittelt, läßt sich nach Gl. 34 leicht die Bindungskapazität B der Latexteilchen pro Einheit ihrer Oberfläche berechnen (Tab. 8).
Ergänzend ist zu sagen, daß alle Proteinbestimmungen einen Mittelwert aus n = 6 Einzelmessungen darstellen.

Auffällig ist die Tatsache, daß die Latexteilchen, unabhängig von ihrem Durchmesser, eine definierte Bindungskapazität für jedes Protein besitzen.

Die hochgereinigten Albumine - HSA und BSA-Digitoxin-Konjugat - zeigen die niedrigsten Bindungskapazitäten, dann folgt die Cohn-Fraktion V des BSA und schließlich die Seren mit einem relativ hohen Anteil an Gamma-Globulinen (Tab. 9).

B S A

Tabelle 3

| Ø der Teilchen | $O_{akt.}$ Latex | $C_{alb.}$ aus Gl. 32 | | $C_{alb.}$ 1. Überstand | | $C_{alb.}$ 2. Überstand | | $C_{alb.}$ 3. Überstand | | $C_{alb.}$ Überstände 1-3 | | $C_{geb.}$ | | $C_{korr.}$ | B |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| um | $cm^2/ml$ | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | $ng/cm^2$ |
| 0,176 | 722,6 | 3.750 | 100 | 3.052,5 | 81,5 | 161,25 | 4,5 | 7,5 | 0,2 | 3.221,25 | 85,9 | 528,75 | 14,1 | 251,8 | 348,5 |
| 0,357 | 372,4 | 3.750 | 100 | 3.292,5 | 87,8 | 133,00 | 3,55 | 2,0 | 0,05 | 3.427,50 | 91,4 | 322,50 | 8,6 | 153,6 | 412,5 |
| 0,794 | 173,9 | 3.750 | 100 | 3.465,0 | 92,4 | 127,50 | 3,4 | 3,75 | 0,1 | 3.596,25 | 95,9 | 153,75 | 4,1 | 73,2 | 420,9 |

$O_{akt.}$ : Die aus Gl. 34 errechnete Latexoberfläche pro ml Ansatz

$C_{alb.}$ : Albumin-Konzentrationen vor und nach dem Zentrifugieren in absoluten Mengen (ng/ml) und in relativen Mengen (%), bezogen auf die in Gl. 32 errechnete Albumin-Konzentration

$C_{geb.}$ : An Latex gebundenes Albumin in absoluten und relativen Mengen vor der Multiplikation mit dem Korrekturfaktor k = 1/2,1

$C_{korr.}$ : Die mit dem Korrekturfaktor k = 1/2,1 multiplizierte gebundene Albumin-Konzentration $C_{geb.}$ $C_{korr.} = k \cdot C_{geb.}$

B : Bindungskapazität der Latexteilchen für BSA in $ng/cm^2$, errechnet alb $B = \frac{C_{korr.}}{O_{akt.}}$

Alle Proteinmengen sind Mittelwerte aus n = 6 Messungen

Tabelle 4

| Ø der Teilchen | $O_{akt.}$ Latex | $C_{alb.}$ aus Gl. 32 | | $C_{alb.}$ 1. Überstand | | $C_{alb.}$ 2. Überstand | | $C_{alb.}$ 3. Überstand | | $C_{alb.}$ Überstände 1-3 | | $C_{geb.}$ | | $C_{korr.}$ | B |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| um | $cm^2/ml$ | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | $ng/cm^2$ |
| 0,176 | 722,6 | 3.750 | 100 | 3.345,0 | 89,2 | 210,0 | 5,6 | 3,75 | 0,1 | 3.558,75 | 94,9 | 191,25 | 5,1 | 91,1 | 126,1 |
| 0,357 | 372,4 | 3.750 | 100 | 3.476,25 | 92,7 | 153,75 | 4,1 | 3,75 | 0,1 | 3.633,75 | 96,9 | 115,25 | 3,1 | 55,4 | 148,8 |
| 0,794 | 173,9 | 3.750 | 100 | 3.558,75 | 94,9 | 127,5 | 3,4 | 7,5 | 0,2 | 3.693,75 | 98,5 | 56,25 | 1,5 | 26,8 | 154,1 |

$O_{akt.}$ : Die aus Gl. 34 errechnete Latexoberfläche pro ml Ansatz

$C_{alb.}$ : Albumin-Konzentrationen vor und nach dem Zentrifugieren in absoluten Mengen (ng/ml) und in relativen Mengen (%), bezogen auf die in Gl. 32 errechnete Albumin-Konzentration

$C_{geb.}$ : An Latex gebundenes Albumin in absoluten und relativen Mengen vor der Multiplikation mit dem Korrekturfaktor k = 1/2,1

$C_{korr.}$ : Die mit dem Korrekturfaktor k = 1/2,1 multiplizierte gebundene Albumin-Konzentration $C_{geb.}$ $C_{korr.} = k \times C_{geb.}$

B : Bindungskapazität der Latexteilchen für HSA in $ng/cm^2$, errechnet als $B = \frac{C_{korr.}}{O_{akt.}}$

Alle Proteinmessungen sind Mittelwerte aus n = 6 Messungen

BSA-Digitoxin

Tabelle 5

| Ø | $O_{akt}$ | $C_{o\ BSA-Dig.}$ | | $C_{BSA-Dig.}$ 1. Überstand | | $C_{BSA-Dig.}$ 2. Überstand | | $C_{BSA-Dig.}$ 3. Überstand | | $C_{BSA-Dig.}$ Überstände 1-3 | | $C_{geb}$ | | $C_{korr}$ | B |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| um | $cm^2/ml$ | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | $ng/cm^2$ |
| 0,176 | 1.445 | 5.000 | 100 | 4.425 | 88,5 | 205 | 4,1 | 10 | 0,2 | 4.640 | 92,8 | 360 | 7,2 | 171,4 | 118,6 |
| 0,357 | 745 | 5.000 | 100 | 4.645 | 92,9 | 160 | 3,2 | 5 | 0,1 | 4.810 | 96,2 | 190 | 3,8 | 90,5 | 121,4 |
| 0,794 | 348 | 5.000 | 100 | 4.740 | 94,8 | 167,5 | 3,35 | 7,5 | 0,15 | 4.915 | 98,3 | 85 | 1,7 | 40,5 | 116,3 |

$O_{akt.}$ : Die aus Gl. 34 errechnete Latexoberfläche pro ml Ansatz

$C_{BSA-Dig.}$: BSA-Digitoxin-Konzentration vor und nach dem Zentrifugieren in absoluten Mengen (ng/ml) und in relativen Mengen (%), bezogen auf eine BSA-Digitoxin-Stammlösung von $C_{oBSA-Dig.} = 5.000$ ng/ml (Kap, 2.2.3)

$C_{geb.}$ : An Latex gebundenes BSA-Digitoxin in absoluten und relativen Mengen vor der Multiplikation mit dem Korrekturfaktor k = 1/2,1

$C_{korr.}$ : Die mit dem Korrekturfaktor k = 1/2,1 multiplizierte gebundene BSA-Digitoxin-Konzentration $C_{geb.}$ $C_{korr.} = k \times C_{geb.}$

B : Bindungskapazitäten der Latexteilchen für BSA-Digitoxin in $ng/cm^2$, errechnet als $B = \frac{C_{korr.}}{O_{akt.}}$

Alle Proteinmessungen sind Mittelwerte aus n = 6 Messungen

Tabelle 6

Beschichtung mit AS gegen BSA-Digitoxin-Konjugat

| Ø der Teilchen | $O_{akt.}$ Latex | $C_{o/AS}$ nach Gl. 38 | | $C_{AS}$ 1. Überstand | | $C_{AS}$ 2. Überstand | | $C_{AS}$ 3. Überstand | | $C_{AS}$ Überstände 1-3 | | $C_{geb}$ | | B |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| um | $cm^2/ml$ | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | $ng/cm^2$ |
| 0,176 | 144,5 | 1.104,3 | 100 | 986,2 | 89,3 | 0,05 | 0,1 | 0,05 | 0,1 | 986,2 | 89,3 | 118,1 | 10,7 | 817,3 |
| 0,357 | 74,5 | 1.104,3 | 100 | 1.041,1 | 94,3 | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 1.041,3 | 94,3 | 63,0 | 5,7 | 845,6 |
| 0,794 | 34,8 | 1.104,3 | 100 | 1.077,1 | 97,5 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 1.077,3 | 97,6 | 27,0 | 2,4 | 775,8 |

$O_{akt.}$ : Oberfläche der Latexteilchen pro ml Ansatz

$C_{AS}$ : AS-Konzentration vor und nach dem Zentrifugieren in absoluten und relativen Mengen bezogen auf eine AS-Stammlösung von $C_{oAS}$ = 1.104,3 ng/ml

$C_{geb.}$ : An Latex gebundenes Antiserum in ng/ml

B : Bindungskapazität der Latexteilchen für AS gegen BSA-Digitoxin-Konjugat, errechnet als $B = \frac{C_{geb.}}{O\ akt.}$

Alle Proteinmessungen sind Mittelwerte aus n = 6 Messungen

Tabelle 7

Beschichtung mit menschlichem Kontrollserum

| Ø der Teilchen | $O_{akt}$ Latex | $C_{o/Kontr.}$ nach Gl. 36 | | $C_{Kontr.}$ 1. Überstand | | $C_{Kontr.}$ 2. Überstand | | $C_{Kontr.}$ 3. Überstand | | $C_{Kontr.}$ Überstände 1-3 | | $C_{geb}$ | | B |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| um | $cm^2/ml$ | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | ng/ml | % | $ng/cm^2$ |
| 0,176 | 144,5 | 1.192,0 | 100 | 1.102,7 | 92,5 | 0,05 | 0,01 | 0,05 | 0,01 | 1.102,7 | 92,5 | 89,3 | 7,5 | 618,0 |
| 0,347 | 74,5 | 1.192,0 | 100 | 1.146,4 | 96,2 | " | " | " | " | 1.146,4 | 96,2 | 45,6 | 3,8 | 612,1 |
| 0,794 | 34,8 | 1.192,0 | 100 | 1.170,8 | 98,2 | " | " | " | " | 1.170,8 | 98,2 | 21,2 | 1,8 | 609,2 |

$O_{akt.}$ : Oberfläche der Latexteilchen pro ml Ansatz

$C_{Kontr.}$: Konzentration des Kontrollserums vor und nach dem Zentrifugieren in absoluten und relativen Mengen, bezogen auf eine Stammlösung des Kontrollserums von $C_{oKontr.} = 1.192$ ng/ml

$C_{geb.}$ : An Latex gebundenes Kontrollserum in ng/ml

B : Bindungskapazität der Latexteilchen für Kontrollserum, errechnet als $B = \frac{C_{geb.}}{O_{akt.}}$

Alle Proteinmessungen sind Mittelwerte aus n = 6 Messungen

| | Ø um | B ng/cm$^2$ | $\overline{B}$ ng/cm$^2$ |
|---|---|---|---|
| BSA | 0,176<br>0,357<br>0,794 | 348,5<br>412,5<br>420,9 | 394,0 |
| HSA | 0,176<br>0,357<br>0,794 | 126,1<br>148,8<br>154,1 | 143,0 |
| BSA-<br>Digitoxin | 0,176<br>0,357<br>0,794 | 118,6<br>121,4<br>116,3 | 118,8 |
| AS gegen<br>BSA-<br>Digitoxin | 0,176<br>0,357<br>0,794 | 817,3<br>845,6<br>775,8 | 812,9 |
| menschl.<br>Kontroll-<br>serum | 0,176<br>0,357<br>0,794 | 618,0<br>612,1<br>609,2 | 613,1 |

Tab. 8
Bindungskapazitäten für Proteinlösungen von Latexteilchen unterschiedlicher Größe und ihre Mittelwerte.

## 2.2.8 DISKUSSION

Aufgrund der Tatsache, daß nach dem dritten Zentrifugieren kaum weiteres Protein von den Latexteilchen gewaschen werden kann, läßt sich schließen, daß die Bindung Latex-Protein relativ fest sein muß. Wahrscheinlich handelt es sich um eine kovalente Bindung zwischen negativ geladenen Carboxylgruppen der Latexoberfläche und positiv geladenen Bezirken der Proteinmoleküle, die auch von anderen Autoren (22) beschrieben wurden.

Interessant ist nun, wie dicht die Latexoberfläche mit Proteinen besetzt ist. Diese Frage läßt sich nur für die Beschichtungsverfahren mit Albumin sinnvoll abschätzen, da hier Größe und Form des Moleküls ungefähr bekannt sind, während die Serum-Fraktionen aus einer Reihe unterschiedlicher Proteine bestehen, die in bezug auf Molekulargewicht, Größe und Konformation nicht genau zu definieren sind.

Nimmt man das Modell für die Albumin-Struktur von Anderegg et al. (22, S. 579) zu Hilfe, so kann man die Anzahl der Albumin-Moleküle abschätzen, die pro Quadratzentimeter Latexoberfläche gebunden werden können. Dabei wird angenommen, daß das Albumin-Molekül bei einem mittleren Molekulargewicht von 66.000 eine Größe von 8,0 x 6,0 x 3,3 $nm^3$ besitzt. Diese Abmessungen gelten annähernd für einen

pH-Bereich von 4,5 bis 11,0. Weiterhin wird bei o.a. Modell angenommen, daß die größtmögliche Bindungsstelle des Albumin-Moleküls eine Fläche von $4{,}8 \times 10^{-13}$ $cm^2$ einnimmt, so daß sich die Anzahl der Protein-Moleküle, die pro Quadratzentimeter mindestens gebunden werden können, errechnet als

Gl. 39 $$n_{min.} = \frac{1}{4{,}8 \times 10^{-13}} = 2{,}1 \times 10^{12}$$

Anhand von Molekulargewicht MG, Avogadro'scher Zahl $N_A = 6{,}02295 \times 10^{23}$ Moleküle/Mol und gemessener Bindungskapazitäten B (Tab. 8) kann nach

Gl. 40 $$n_{akt.} = \frac{B \times N_A}{MG}$$

die Anzahl der gebundenen Albumin-Moleküle $n_{akt.}$ berechnet werden. Setzt man diese Werte in Beziehung zu den Werten Gl. 39, erhält man direkt den prozentualen Anteil der bedeckten Latexoberfläche:

Gl. 41 $$\text{Beschichtung: } \frac{n_{akt.}}{n_{min.}} \times 100 \; [\%]$$

Die Ergebnisse sind in der Tab. 9 zusammengefaßt. Die vorgenannten Berechnungen gelten selbstverständlich nur unter der Voraussetzung, daß während und nach dem Bindungsvorgang keine Konformationsänderung des Albumin-Moleküls auftritt. Inwieweit diese Annahme den Tatsachen entspricht, kann bisher noch nicht nachgewiesen werden. Berücksichtigt man zudem die möglichen Fehlerbreiten bei Molekulargewicht,

Größe der Bindungsstellen und Konformation des Albumin-Moleküls, sieht man, daß die in Tab. 9 angegebenen Werte nur grobe Abschätzungen der tatsächlich gebundenen Proteinmoleküle wiedergeben können.

Nach diesen Berechnungen wären bei der Beschichtung mit Human-Serum-Albumin durchschnittlich 62 % der Latexoberfläche bedeckt, bei BSA-Digitoxin-Konjugat etwa 52,5 %. Diese Werte liegen ca. 10-15 % höher als die von Dezelic et al. (22) gefundenen. Das mag einmal eine Ursache in den etwas abweichenden Versuchsbedingungen (pH-Wert, Ionenstärke) haben, zum anderen spielt auch der Reinheitsgrad der verwendeten Proteinchargen keine unwesentliche Rolle. Außerdem wurden von Dezelic et al. die Emulgatoren aus der Latexsuspension vor der Inkubation nicht entfernt, die eine weitere Verminderung der Beschichtung verursachen könnten.

Diese Unterschiede mögen die höhere Beschichtungsrate bei den vorliegenden Versuchen erklären. Erstaunlich ist, daß trotz großem Proteinüberschuß im Inkubationsansatz und theoretisch nahezu idealen Versuchsbedingungen nur wenig mehr als die Hälfte der Latexoberfläche bedeckt sein soll.

Eine mögliche Erklärung dieses Verhaltens besteht in der Annahme einer Konformations- oder Strukturänderung der Proteinmoleküle in der Form, daß sich die freien, nicht gebundenen Molekülanteile durch elektrostatische Bindungen und/oder durch Disulfid- oder Wasserstoffbrücken über die noch freie Oberfläche der Latexteilchen ausbreiten und diese gegen eine weitere Beschichtung abschirmen. Für diese These spricht auch die große Stabilität der beschichteten Latexkügelchen gegen Elektrolyte, die ein Hinweis auf eine vollständige Abdeckung der Latexoberfläche ist (21).

Andererseits darf die geforderte Konformationsänderung nicht diejenigen Teile des Moleküls betreffen, die mit ihren spezifischen Antikörpern reagieren können. Da ist auch nicht der Fall wie die in Kap. 3 beschriebenen Versuche beweisen. Die Proteine behalten ihre immunologische Aktivität, eine wesentliche Voraussetzung für ihren Einsatz in immunologischen Testverfahren.

Konsequenterweise muß man, postuliert man überhaupt eine Konformationsänderung des Moleküls, annehmen, daß diese in den Teilen des Moleküls auftritt, die für eine Immunreaktion von geringer Bedeutung sind. Ein direkter Nachweis für diese Hypothese steht noch aus.

Die Beschichtung mit Rinder-Serum-Albumin (BSA) ergibt einen deutlich höheren Wert als theoretisch berechnet (Tab. 9). Nimmt man an, daß das Modell von Anderegg et al. zutreffend ist und die Proteinbestimmungen korrekt vorgenommen wurden, muß man nach einer anderen Ursache für dieses Phänomen suchen.

Eine mögliche Erklärung bietet die Beschaffenheit des Rinder-Serum-Albumins selbst. Bei der verwendeten Charge handelt es sich um die Cohn-Fraktion V des Rinder-Serum-Albumins, das noch ca. 8 % Verunreinigungen in Form größerer Proteine, besonders Globulinen, enthält. Diese zeigen, wie auch einige andere Autoren nachgewiesen haben (49, 50, 60), eine größere Affinität zum Latexteilchen als Albumin-Moleküle. Durch das um ein Vielfaches höhere Molekulargewicht dieser Proteine wäre auch der scheinbar zu hoch gemessene Proteinanteil bei der Beschichtung mit Rinder-Serum-Albumin erklärbar.

Für eine größere Affinität der Globuline zum Latex sprechen auch in der vorliegenden Arbeit zwei Gründe:

1. wurde von den verwendeten Seren ein deutlich größerer - nämlich ein 5-7-fach höherer - Masseanteil Protein pro Quadratzentimeter Latexoberfläche gebunden als von den hochgereinigten Albumin-Chargen (Tab.8),

2. ließen sich weit weniger hohe Proteinkonzentrationen nach den "Waschvorgängen" in den Überständen nachweisen als bei den Albuminen. Das geht deutlich aus dem Vergleich der Spalten 2. bzw. 3. Überstand der Tab. 3 bis 7 hervor.

Große Proteine scheinen also nicht nur in größerer Menge, sondern auch fester an Latex gebunden zu werden als die relativ kleinen Albumin-Moleküle.

Eine Berechnung des beschichteten Teils der Latexoberfläche durch Abschätzung der Zahl der gebundenen Moleküle ist für Antiseren oder andere Proteingemische, die ein ganzes Spektrum größen- und mengenmäßig nicht genau definierter Proteine enthalten, und bei denen zudem Zahl und Form der Bindungsstellen unbekannt sind - wie auch das Beispiel BSA (Cohn-Fraktion V) zeigt (Tab. 9) - heute noch nicht mit der nötigen Genauigkeit durchführbar.

Tabelle 9

| | HSA | | BSA-Digitoxin Konjugat | | BSA (Cohn-Fraktion) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ø der Latexteilchen | $n_{(akt.)}$ | $\frac{n_{(akt.)}}{n_{min.}} \times 100$ | $n_{(akt.)}$ | $\frac{n_{(akt.)}}{n_{min.}} \times 100$ | $n_{(akt.)}$ | $\frac{n_{(akt.)}}{n_{min.}} \times 100$ |
| 0,176 u | $1,2 \times 10^{12}$ | 57,1 % | $1,1 \times 10^{12}$ | 52,4 % | $3,2 \times 10^{12}$ | 152,4 % |
| 0,357 u | $1,4 \times 10^{12}$ | 66,7 % | $1,1 \times 10^{12}$ | 52,4 % | $3,8 \times 10^{12}$ | 181,0 % |
| 0,794 u | $1,4 \times 10^{12}$ | 66,7 % | $1,1 \times 10^{12}$ | 52,4 % | $3,8 \times 10^{12}$ | 181,0 % |
| Mittelwert für alle 3 Latexgrößen | $1,3 \times 10^{12}$ | 61,9 % | $1,1 \times 10^{12}$ | 52,4 % | $3,6 \times 10^{12}$ | 171,4 % |

Anzahl der Prot.-Moleküle, die pro $cm^2$ Latexoberfläche gebunden wurden $n_{(akt.)}$ und prozentualer Anteil der beschichteten Oberfläche nach dem Anderegg-Modell (22) $n_{min.}$ bedeutet die Mindestanzahl von Molekülen, die pro $cm^2$ Latexoberfläche gebunden werden können. $n_{min.} = 2,1 \times 10^{12}$ Moleküle/$cm^2$ (s. Text und Gl. 39 bis 41).

## 2.3 BESCHREIBUNG EINES MESSPLATZES FÜR DIE LASER-DOPPLER-SPEKTROSKOPIE

Der Grundaufbau eines Meßplatzes für die Laser-Doppler-Spektroskopie bleibt für alle bisher bekannten Anwendungsmöglichkeiten identisch, nur die Meßzellen (s. Kap. 2.4) müssen je nach Aufgabenstellung variiert werden. Der Aufbau läßt sich in drei Teile gliedern: einen mechanischen, einen optischen und einen elektronischen Teil. Eine genaue und detaillierte Beschreibung des gesamten Aufbaus findet sich bei Steiner (63) auf den Seiten 56 bis 66, so daß hier nur eine kurze Zusammenfassung des Meßaufbaus gegeben wird.

### 2.3.1 MECHANISCHER TEIL

Notwendige Voraussetzung für gute Meßergebnisse ist ein schwerer schwingungsgedämpfter Meßtisch, auf dem die optischen Komponenten justiert werden können. Auf dieser Meßplatte steht ein ebenfalls schwerer Goniometertisch, der frei um die senkrechte Raumachse drehbar sein muß, damit das darauf montierte Detektorsystem (Photomultiplier) jeden beliebigen Meßwinkel einnehmen kann. Auf der Mitte des Goniometertisches ist auf einem feststehenden Metallbock ein Meßtisch befestigt (15 x 15 $cm^2$), der die Meßzelle trägt. Dieser Meßtisch ist in allen drei Richtungen des Raumes verstellbar und kann zusätzlich Rotationsbewegungen ausführen, so daß die Meßzelle in der horizontalen Ebene gegen den Laserstrahl verdrehbar ist.

Bei den Lasern handelt es sich um einen Helium-Neon-Laser ( $h_o$ = 632,8 nm; 15 mW) und einen Argon-Laser ($h_o$ = 476,5 nm bzw. 488,0 nm; 2,0 W) der Firma Spectra Physics, die - ebenfalls schwingungsgedämpft - in Höhe des Detektorsystems stehen und auf die Drehachse des Goniometertisches einjustiert sind.

### 2.3.2 OPTISCHER TEIL

Um ein optimales Streuvolumen (s. Kap. 2.1.2) zu erhalten, wird der Laserstrahl durch zwei Blenden eingeengt, die evtl. auftretendes inkohärentes Laserlicht abhalten sollen, und anschließend durch eine Sammellinse auf die zu untersuchende Probe fokussiert. Das anfallende Streulicht wird von dem Detektorsystem, bestehend aus einem Photomultiplier und einem Blendensystem, das auf eine Kohärenzfläche im Streuvolumen abgestimmt ist, aufgefangen und an ein datenverarbeitendes Computersystem weitergeleitet.

### 2.3.3 ELEKTRONISCHER TEIL

Der Photomultiplierstrom wird von einem Vorverstärker (Keithly Model 103 A oder PAR Model 103) mit eingebautem Bandpassfilter verstärkt. Die so erzielte Begrenzung des Frequenzumfangs des Dopplersignals ist für die folgende Signalauswertung von Bedeutung. Das auf diese Weise verstärkte und gefilterte Signal wird einem Frequenzanalysator bzw. Autokorrelator zugeleitet, der entweder das "power"-Spektrum (PS) oder die Autokorrelationsfuktion (ACF) aus den anfallenden Daten bildet.

Sowohl das Detektorsignal als auch die errechneten Funktionen (ACF; PS) lassen sich auf einem Oszillographen darstellen und durch einen Drucker (Plotter) aufzeichnen. Die Speicherung der Daten auf Magnetplatte ist möglich. Ein Schema zum experimentellen Aufbau zeigt Abb. 3.

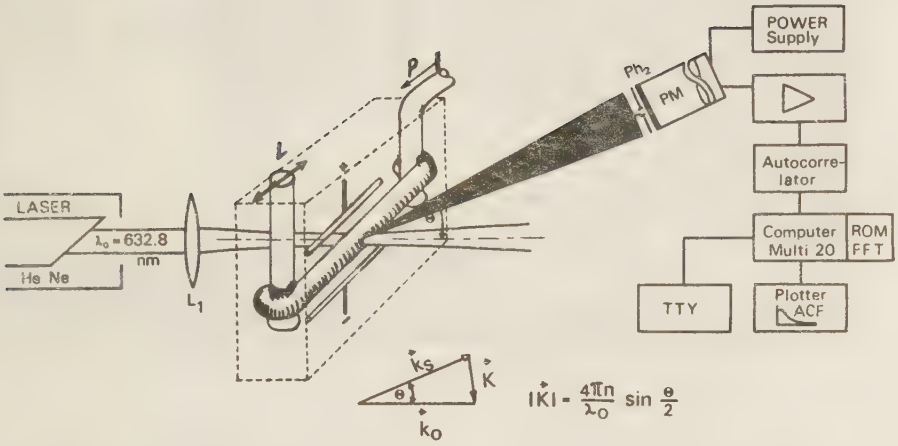



Abb. 3: Experimenteller Aufbau und Streugeometrie für quasi-elastische Rayleigh-Streuung.
$\vec{K}_o$ ist der Wellenvektor des einfallenden Laserlichts, $\vec{K}_s$ der Wellenvektor des Streulichts, das unter dem Winkel $\Theta$ abgestrahlt wird.
PM: Photomultiplier ; TTY: Teletype

## 2.4 MESSZELLEN

Je nach Aufgabenstellung und, abhängig von den Versuchsbedingungen, muß im Zentrum des Goniometertisches die richtige Meßzelle installiert werden.

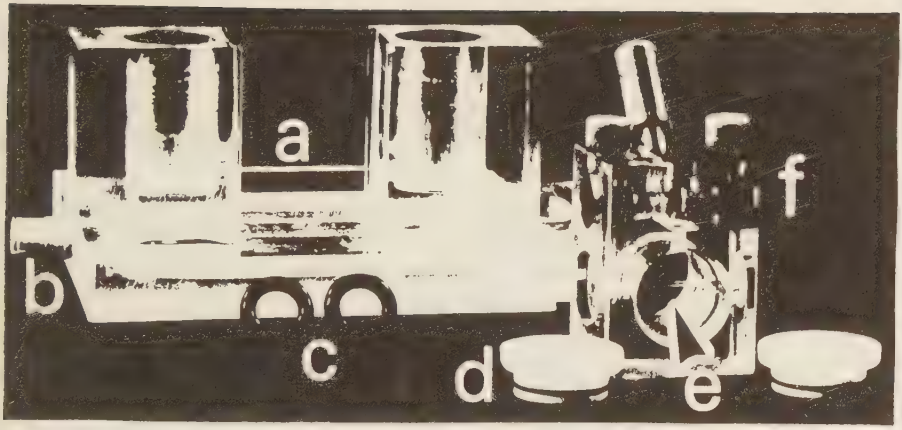
### 2.4.1 MESSZELLEN FÜR DIFFUSIONSMESSUNGEN

Für einfache Diffusionsmessungen unter homodynen Bedingungen (s. a. Kap. 2.1.8) reichen handelsübliche Spektrometerküvetten vollständig aus. Auch runde Reagenzgläser aus optischem Spezialglas wurden bei der vorliegenden Arbeit verwendet. Der Durchmesser der Meß- küvetten variierte je nach Aufgabenstellung von mehreren Mikrometern bis hin zu einem Zentimeter. Nähere Einzelheiten zu den verwendeten Meßzellen finden sich in den jeweiligen Kapiteln.

### 2.4.2 MESSZELLEN FÜR ELEKTROPHORESEMESSUNGEN

Für Elektrophoresemessungen mit Hilfe der Laser-Doppler-Spektroskopie benötigt man eine speziell für diese Aufgabe konstruierte Meßzelle. Diese im hiesigen Institut entwickelte Elektrophoresekammer besteht aus zwei Pufferbehältern mit je einer Platinelektrode, die durch eine Glaskapillare (Pyrex; 1,6 mm Außen-Ø; 0,86 mm Innen-Ø) als Elektrophoresestrecke miteinaner verbunden sind (s. Abb. 4).

Pufferbehälter und Probenvolumen in der Kapillare sind durch Dialysemenbranen getrennt, so daß keine unerwünschten Reaktionen an den Elektroden auftreten können. Die mittlere Größe des elektrischen Feldes betrug bei fast allen Versuchen E = 50 V/cm (100 Volt auf 2 cm Elektrophoresestrecke). Die Richtung des Stroms wurde während der Experi-



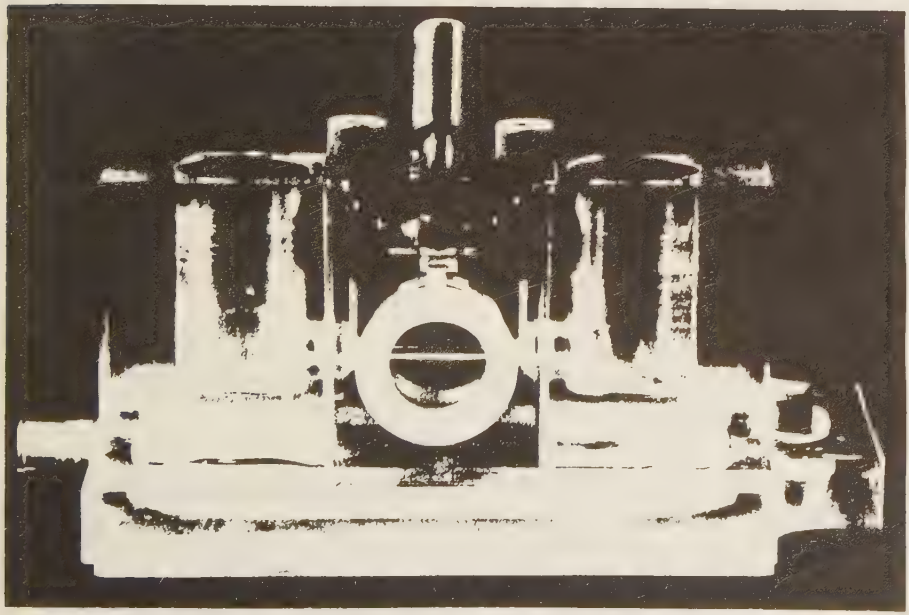



Abb. 4: Meßzelle für Elektrophoresemessungen
a: Elektrophoresestrecke zwischen den beiden Pufferbehältern,
b: Anschlußbuchse für elektrische Spannung, c: Dichtungsringe,
d: Dichtung für die Kühlvorrichtung, e: Meßkapillare,
f: herausnehmbarer Meßblock mit Einfüllstutzen

mente in regelmäßigen Abständen von 5 bis 25 Sekunden umgekehrt. Da die Beschleunigungszeit für die verwendeten Teilchen oder Moleküle mit kleiner $10^{-6}$ Sekunden sehr gering ist, fällt sie als der Elektrophorese überlagerte Komponente

Für die Berechnung des Wellenvektors $\bar{K}$ muß als Streuwinkel der tatsächliche Streuwinkel in der Lösung, genannt $\theta'$, angegeben werden. Dieser errechnet sich analog der Gl. 5 für senkrecht zum Laserstrahl stehende Meßzellen als

Gl. 42 $$|\bar{K}| = \frac{4\pi n}{h_o} \times \sin \theta'/2$$

Nach Steiner (63, S 68) ist der Winkel $\theta$, unter dem das Streulicht gemessen wird, und der Streuwinkel $\theta'$ innerhalb der Kapillare durch die Beziehung

Gl. 43 $$\theta'/2 = 1/2 \arcsin\left(\frac{\sin \theta}{n}\right)$$

miteinander verknüpft, so daß sich der Wellenvektor $\bar{K}$ berechnen läßt als

Gl. 44 $$|\bar{K}| = \frac{4\pi n}{h_o} \times \sin \left[1/2 \arcsin\left(\frac{\sin \theta}{n}\right)\right]$$

Für einige Versuche war es notwendig, die Meßzelle um den halben Meßwinkel $\theta$ nachzuführen. Aus Gl. 42 und der Beziehung

Gl. 45 $$\theta'/2 = \arcsin\left(\frac{\sin \theta/2}{n}\right)$$

folgt nach Steiner (63, S 69)

Gl. 46 $$|\bar{K}| = \frac{4\pi n}{h_o} \times \sin \Theta/2$$

Bei Meßzellen, die um den halben Meßwinkel $\Theta$ nachgeführt werden, vereinfacht sich die Berechnung des Wellenvektors K, da in diesen Fällen der Brechungsindex n nicht in die Berechnung eingeht. Abb. 5 zeigt ein Beispiel für die Winkelabhängigkeit der Dopplerfrequenz $f_D$ für Latexteilchen ($\varnothing$ = 0,357 um) bei einem elektrischen Feld der Stärke E = 55 V/cm bei nachgeführter Meßzelle.

Das Probenvolumen betrug in den verwendeten Meßkammern lediglich um die 100 ul pro Probe, die sich aus Fassungsvermögen von Kapillare - ca. 12 ul - und dem Totraum aus Ein- und Auslauföffnungen zusammensetzen.

Die Füllung der Kapillaren läßt sich durch den genormten Einfüllstutzen mit jeder normalen Einmalspritze vornehmen. Wegen des geringen Fassungsvermögens der Kapillare haben sich 1 ml-Spritzen, wie sie zur Tuberkulintestung verwendet werden, sehr bewährt.

Elektroosmotische Effekte werden durch die Beschichtung der Kapillaren durch Methylzellulose (s. Kap. 2.5) ausgeschaltet. Thermische Effekte, die bei der Elektrophorese höherionaler Elektrolytlösungen auftreten können, werden durch Kühlung der Kapillare verhindert.

Eine genaue und detaillierte Beschreibung der Entwicklung und der Konstruktion der Elektrophoresezellen sowie deren Handhabung mit Vor- und Nachteilen gibt Steiner (63, Kap. 3.2).

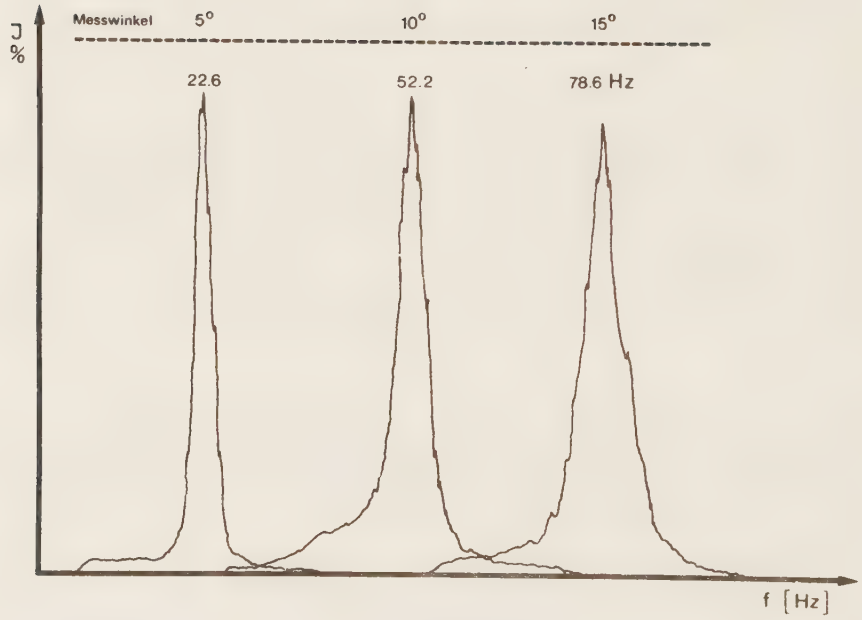



Abb. 5: Beispiel für die Winkelabhängigkeit der Dopplerfrequenz $f_D$ für beschichtete Latexteilchen (d = o,357 um), c = 5 x $10^6$ part./ml ; E = 55 V/cm

## 2.5 BESCHICHTUNG DER MESSKAPILLAREN

Zur Ausschaltung elektroosmotischer Strömungen, die durch elektrisch bedingte Interaktionen zwischen Kapillarwand und Ionen der Elektrolytlösung entstehen, hat sich die Beschichtung der Kapillarwände mit Methylzellulose bestens bewährt.

Bei einwandfreier Beschichtung der Kapillaren waren keine elektroosmotischen Störungen während der Elektrophoresemessungen nachweisbar. Abb. 6 zeigt die Qualität der Beschichtung mit Zellulose im Vergleich zu nichtbeschichteter Kapillare bzw. zur Beschichtung mit Silikon.

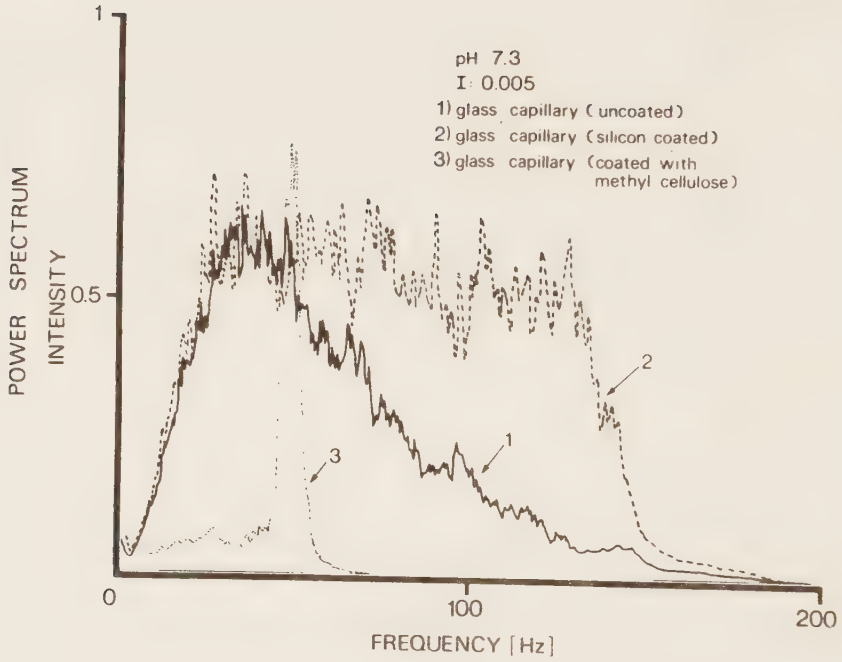



Abb. 6: Elektrophoresemessungen standardisierter Erythrozyten, Vergleich unterschiedlicher Beschichtungen der Meßkapillare:

1) unbeschichtete Glaskapillare mit starker, inhomogener Elektroosmose,
2) Silikonbeschichtung mit irregulärem Geschwindigkeitsprofil,
3) Beschichtung mit Methylzellulose mit elektroosmosefreier Elektrophorese

(aus: 63, S. 1o2)

## 3. EXPERIMENTELLER TEIL

In diesem Kapitel werden die Versuche zu den schon in der Einleitung erwähnten Immunsystemen dargestellt. Soweit nicht bereits in Kap. 2 geschehen, wird in den folgenden Darstellungen auch noch kurz auf den Einfluß von pH-Wert, Ionenstärke und Konzentrationen der gemessenen Teilchen auf die Diffusionskonstante D bzw. auf die Mobilität $\mu$ eingegangen.

In der Mehrzahl der beschriebenen Versuche dienen Latexpartikel als Trägerteilchen von Proteinen, seien es jetzt Eiweißkörper mit Antigen- oder Antikörpercharakter.

Die gleichmäßige Beschichtung dieser Teilchen (Kap. 2) ist notwendige Voraussetzung für die Zuverlässigkeit und für die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse. Es schien deshalb sinnvoll, vor jeder Versuchsreihe die beschichteten und unbeschichteten Latexteilchen zuerst einmal allein zu testen, um eventuelle Unregelmäßigkeiten der Teilchen selbst oder bei deren Beschichtung auszuschließen. Die entsprechenden Versuche werden in den Kapiteln der einzelen Immunsysteme beschrieben. Sie dienen quasi der Leerwert-Bestimmung des jeweiligen Immunsystems.

Generell ist zu sagen, daß unbeschichtete Latexteilchen - ganz gleich, ob sie dialysiert wurden oder nicht - keine verwertbaren Ergebnisse liefern, d.h. es entstehen keine reproduzierbaren "power"-Spektren oder Autokorrelationsfuktionen bei Diffusionsmessungen und auch keine definierten

Elektrophorese-"peaks". Abb. 7 soll diesen Sachverhalt verdeutlichen.

Zum Nachweis einer Immunreaktion mit der Laser-Doppler-Spektroskopie wurden zunächst genau definierte Antigen-Anti-

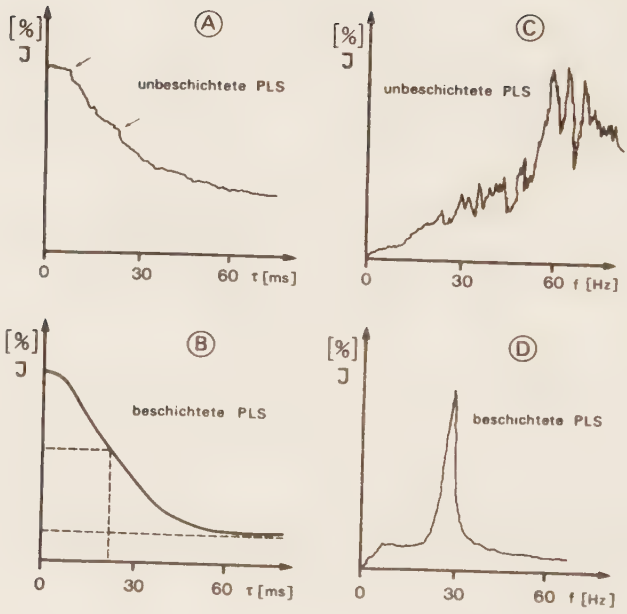



Abb. 7: Beschichtete und unbeschichtete Latexteilchen im Vergleich

A und C: keine eindeutige Bestimmung von $\tau_A$ bzw. von $f_D$ bei unbeschichteten Latexteilchen möglich.

B und D: eindeutig bestimmbare Werte für $\tau_A$ und $f_D$ bei beschichteten Latexteilchen.

körper-Systeme ausgewählt, die unter standardisierten Bedingungen (pH-Wert, Ionenstärke, etc.) getestet wurden. Die Messungen erfolgten einmal über die Diffusionskonstande D, zum anderen durch Elektrophorese über die Dopplerfrequenz $f_D$ bzw. über die daraus errechnete Mobilität $\mu$.

## 3.1 ALBUMIN-IMMUNO-ASSAY

Als Reagenzien für diesen Immuno-Assay dienten

1) die mit BSA beschichteten Latexteilchen, deren Herstellung in Kap. 2.2.1 beschrieben ist.
2) die mit HSA beschichteten Latexteilchen aus Kap. 2.2.2
3) Antiserum gegen BSA vom Kaninchen der Firma Behring Werke AG, Marburg/Lahn
4) Antiserum gegen HSA BSA vom Kaninchen der Firma Behring-Werke AG, Marburg, Chargen-Bezeichnung ORCB 04/05, K.-/Lot-Nr. 3103 B mit T (mg/ml) = 1,07
5) diverse Pufferlösungen, deren Eigenschaften an entsprechender Stelle geschildert werden
6) Aqua bidest.

Alle Pufferlösungen wurden vor Gebrauch zweimal durch Micropore-Filter mit einem Durchmesser von 0,22 um (Firma Millipore S.A., 67 Molsheim/France) gepreßt, um Verunreinigungen wie Staubteilchen etc. zu entfernen und mit 0,02 % (= 3 mM) Natriumazid ($NaN_3$) als Konservierungsmittel versetzt. Alle benutzten Hilfsmittel wie Pipetten, Reagenzgläser, Küvetten, etc. wurden vor den Versuchen staub- und keimfrei gemacht.

### 3.1.1 LATEX-DIFFUSIONS-TEST MIT RINDER-SERUM-ALBUMIN (BSA)

Um den Einfluß der Konzentration der Latexteilchen auf die Diffusinskonstante D zu ermitteln, wurden die beschichteten Teilchen zunächst in einer Verdünnungsreihe, d.h. ohne Antiserum-Zusatz gemessen.

#### 3.1.1.1 EINFLUSS DER LATEX-KONZENTRATION UND VERSCHIEDENER PUFFERMEDIEN AUF DIE DIFFUSIONSKONSTANTE D

Um unspezifische Einflüsse der Latex-(cPLS-)Konzentration auf die Diffusions-Konstante D auszuschließen, wurden zunächst Verdünnungsreihen der Latexteilchen allein mit verschiedenen Pufferlösungen angesetzt. Nachdem die Teilchen durch zweimaliges "Waschen" mit den entsprechenden Lösungen umgepuffert wurden, erfolgte der Ansatz einer Verdünnungsreihe mit dem jeweiligen Puffermedium (Verdünnungsfaktor 1:5), beginnend mit einer Teilchen-Konzentration von $10^{10}$ part./ml bis hinunter zu einer Konzentration von $10^{3}$part./ml.

Verwendet wurden die Latexteilchen aller drei Chargen, die in Tab. 3 beschrieben sind. Die Messungen erfolgten mit dem in den Kap. 2.3 bis 2.5 beschriebenen Aufbau mit dem Argon-Laser bei einer Wellenlänge von $h_o$ = 488,0 nm unter homodynen Bedingungen. Als Meßzelle diente eine runde Glasküvette aus optischem Spezialglas der Firma Hellma, Mülheim/Baden, mit einem Innendurchmesser von 8,1 mm. Das Probenvolumen betrug 5,0 ml. Um Strömungen durch Einfüllen der Probe und Konvektion zu vermeiden, die zu Verfälschungen der Diffusionskonstanten D führen würden, ruhte die gefüllte Küvette vor jeder Messung erst fünf Minuten auf der Meßplatte des Goniometertisches. Abb. 8 zeigt - stellvertretend

für alle Latexchargen - für Teilchen des Durchmessers d = 0,794 um, daß die Diffusions-Konstante D kurz nach dem Einfüllen der Proben durch unspezifische Einflüsse schnell ansteigt mit einem Maximum bei ca. zwei Minuten, um sich dann nach etwa vier Minuten auf einen bestimmten Wert, der über mindestens zehn Stunden konstant bleibt, einzupendeln. Man kann also davon ausgehen, daß nach fünf Minuten keine Verfälschungen der Messungen durch den Einfüllvorgang mehr auftreten.

Die Messungen erfolgten unter verschiedenen Meßwinkeln. Die Versuche zeigten, daß für diesen Versuchsaufbau die beste Signalausbeute bei einem Meßwinkel von $\theta = 60^{o}$ zu erzielen ist, so daß die Verdünnungsreihen unter diesem Winkel gemessen wurden.

Zunächst zeigten die Versuchsergebnisse eine relativ breite Streuung, die für monodisperse Latexsuspensionen mit konstantem Teilchen-Durchmesser zunächst nicht zu erklären war. Betrachtungen der Latexteilchen unter dem Phasenkontrastmikroskop (Ölimmersion) ergaben, daß ca. 50-60 % der beschichteten Latexteilchen nicht in der monomeren Form sondern als Aggregate von meist 2-6 Teilchen vorlagen. Diese entstehen wahrscheinlich beim Zentrifugierender Teilchen bei hohen Umdrehungen. Die hohen g-Zahlen dürften eine Verklumpung der Teilchen verursachen, die durch das anschließende Lösen in den Puffermedien nicht vollstän- dig aufgehoben werden kann. Als Lösung dieses Problems bot sich die Anwendung einer Ultraschallsonde an, die die beschichteten Latexteilchen in die monomere Form zurückführen sollte. Durch diese Behandlung wurden die Resultate der Messungen schlagartig verbessert. Die Streubreite der Meßwerte sank signifikant. Unter dem Mikroskop fanden sich fast nur noch Latexteilchen in der monomeren Form, vereinzelt tauchten Dimere auf, größere Aggregate waren nach Ultraschallbehandlung äußerst selten.

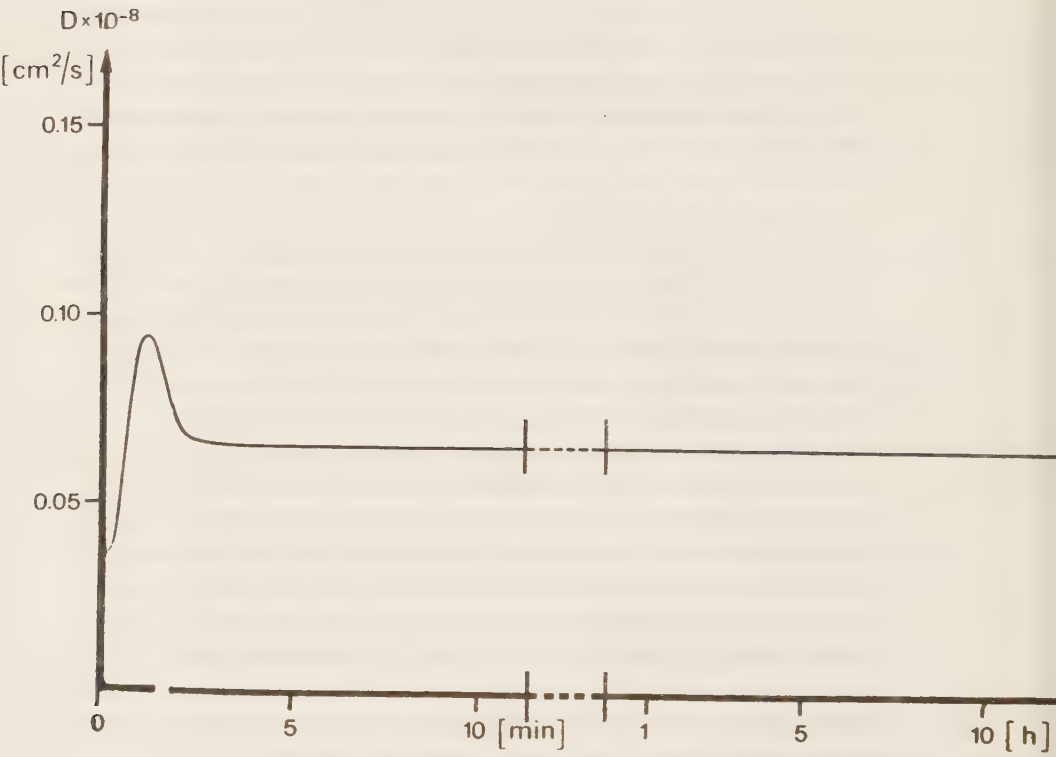



Abb. 8: Verhalten der Diffusionskonstante D beschichteter Latexteilchen nach dem Einfüllen in die Meßkuvette. In den ersten Minuten nach dem Einfüllen zeigt sich eine starke Inkonstanz der Meßwerte, die nach einer Zeit von etwa 4 Minuten sich auf einen konstanten Wert einpendelt, der über Stunden unverändert erhalten bleibt. Messungen, die frei von Störungen durch den Einfüllvorgang sind, können also nach etwa 4 bis 5 Minuten durchgeführt werden.

Die Messungen der Latexverdünnungsreihen in der o.a. Form zeigten, daß die Konzentration der Latexteilchen über einen weiten Bereich keinen Einfluß auf die Diffusions-Konstante D besitzt. Für alle Konzentrationen der $10^3$ part./ml bis $2 \times 10^7$ part./ml blieb sie auf einem konstanten Niveau mit einer Standardabweichung von ca. $\pm$ 5 %. Auch bei den höheren Konzentrationen blieb der Mittelwert ungefähr gleich, doch stieg die Standardabweichung vom Mittelwert schnell auf Werte von über $\pm$ 25 % an, so daß keine brauchbaren Werte für die Diffusions-Konstante mehr anzugeben waren. Dieser Effekt rührt wahrscheinlich von einer Mehrfachstreuung des Laserlichts her, die durch die hohe Teilchendichte der Probe verursacht werden könnte. Die besten Streulichtsignale mit den genauesten Ergebnissen wurden bei Latexkonzentrationen von $10^5$ part./ml bis $2 \times 10^7$ part./ml erzielt, unabhängig vom Durchmesser der Latexteilchen. Bei diesen Konzentrationen lagen die Mittelwerte der Diffusions-Konstanten D bei $2{,}58 \times 10^{-8}$ $cm^2/s$ für die Teilchen mit einem Durchmesser von 0,176 um, bei $1{,}20 \times 10^{-8}$ $cm^2/s$ bei denjenigen mit 0,357 u Durchmesser und bei $0{,}59 \times 10^{-8}$ $cm^2/s$ bei denen mit 0,794 um Durchmesser.

Die vorliegenden Messungen wurden in fünf unabhängigen Reihen mit fünf verschiedenen Pufferlösungen, die alle unterschiedliche Zusammensetzungen, pH-Werte und Ionenstärken I aufwiesen, durchgeführt:

1) in physiologischer NaCl-Lösung aus handelsüblichen Infusionsflaschen, I = 0,154,
2) in Tris-HCl-Puffer, pH = 8,6, I = 0,005,
3) in Tris-HCl-Puffer, pH = 8,6, I = 0,01,
4) in Essigsäure-NaOH-Puffer, pH = 5,4, I = 0,1,
5) in Phosphatpuffer-Lösung, pH = 7,42, I = 0,176

Die Versuche ergaben, daß jede Latexcharge über den gesamten Meßbereich einen konstanten Mittelwert für die Diffusions-Konstante D besitzt. Die Wahl der Pufferlösungen hat bei den vorgenannten Systemen trotz unterschiedlicher Zusammensetzungen, pH-Werte und Ionenstärken offensichtlich keinen Einfluß auf die Diffusion von BSA-beschichteten Latexteilchen. Abb. 9 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen mit ihren Standardabweichungen für eine Verdünnung mit Tris-HCl-Puffer (pH = 8,6, I = 0,005).

Die Ergebnisse der Versuche mit den vier übrigen Puffersystemen lagen alle innerhalb der Standardabweichungen für das o. a. System, so daß auf eine graphische Darstellung dieser Werte verzichtet werden kann.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß offensichtlich weder die Zusammensetzung der Puffermedien, noch pH-Wert oder Ionenstärke innerhalb der vorgenannten Bereiche Einfluß auf die Diffusionskonstante D und somit auf die Brown'sche Molekularbewegung beschichteter Latexteilchen besitzt.

Da die besten Streulichtsignale bei Werten zwischen $10^5$ part./ml und $10^7$ part./ml beobachtet wurden, sollten die Latexkonzentrationen auch in den Ansätzen für Immunreaktionen in diesem Bereich liegen.

### 3.1.1.2 BSA-IMMUNO-ASSAY

In den nachfolgenden Versuchen soll gezeigt werden, daß zwischen der Diffusions-Konstanten D und der Konzentration der Antikörper gegen Rinder-Serum-Albumin bei Latexteilchen eine direkte Beziehung besteht. Dieser Zusammenhang ist auch theoretisch begründet: stehen die Konzentrationen von Antigenen (Ag) und Antikörpern (Ak) in einem bestimmten Verhält-

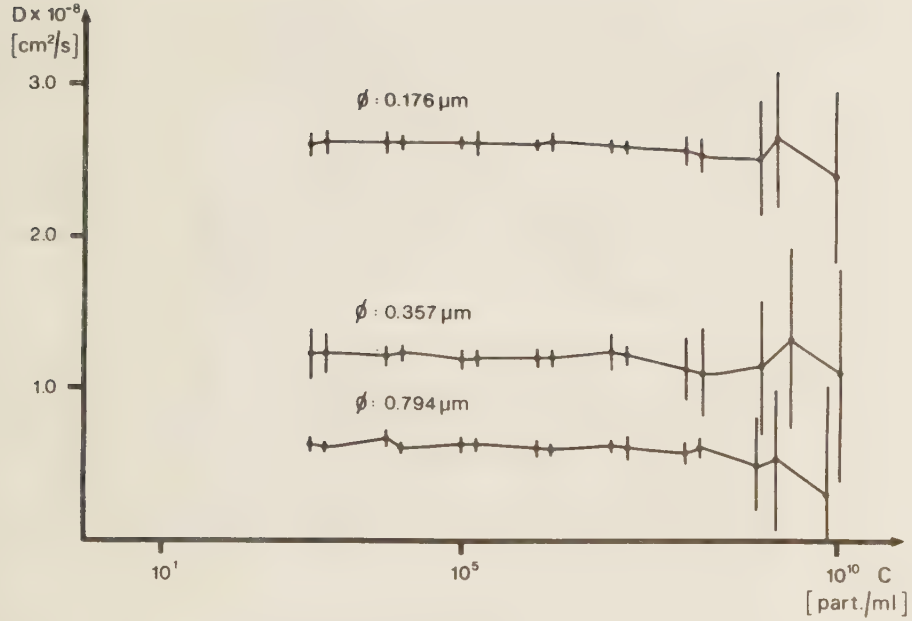



Abb. 9: Diffusionskonstante D als Funktion der cPLS-Konzentration für verschiedene Latexchargen. Homodyne Meßbedingungen, $\Theta = 60^{\circ}$, $h_o = 488{,}0$ nm

nis zueinander, so wird - bei entsprechenden Versuchsbedingungen - eine Ag-Ak-Reaktion stattfinden. Es wird eine Agglutination von BSA-beschichteten Latexteilchen durch das vorhandene AS hervorgerufen. Die durchschnittliche Größe der Aggregate wird wachsen und damit die Diffuionsgeschwindigkeit der Teilchen sinken: die Diffusionskonstante wird kleiner. Je mehr sich das Verhältnis der Reaktionspartner dem Reaktionsoptimum nähert, desto größer und/oder häufiger werden die Aggregate und desto geringer die Diffuionsgeschwindigkeit.

Zeichnet man die Autokorrelationsfunktionen zweier Reaktionsansätze mit unterschiedlicher Antikörperkonzentration gegeneinander auf, so läßt sich nachweisen, daß höhere Ak-Konzentrationen zu einer stärkeren Agglutination der Latexteilchen führen als niedrigere Konzentrationen. Die Linienbreite, d.h. die Halbwertszeit $\tau_A$ (Kap. 2.1.5 und Gl. 23) wird größer.

Abb. 10 zeigt die Autokorrelationsfunktionen zweier Reaktionsansätze BSA-beschichteter Latexteilchen (Ø : 0,357 um) nach Zugabe unterschiedlicher Mengen des entsprechenden Antiserums:

Kurve a: 1.000 ng Ak/ml Ansatz,
Kurve b: 60 ng Ak/ml Ansatz

Die Abbildung zeigt einen deutlichen Unterschied in den Halbwertszeiten $\tau_A$ beider Funktionen. Es muß eine Verlangsamung der Diffusionsgeschwindigkeit durch Vergrößerung der Aggregate stattgefunden haben. Die Werte der Abb. 10 stellen nur einen groben Screening-Test dar. Die systematische Untersuchung der Ag-Ak-Reaktion bei BSA erfolgte nach folgendem Schema:

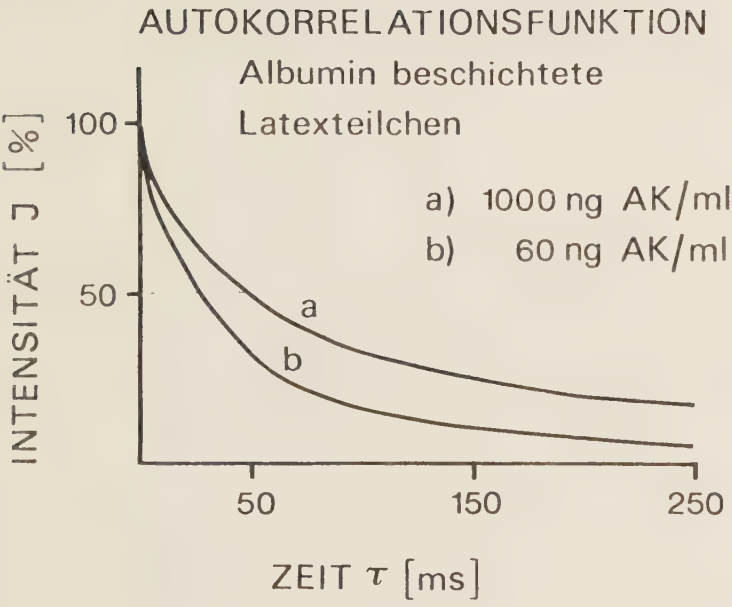



Abb. 1o: Autokorrelationsfunktionen Albumin-beschichteter Latexteilchen mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen. Höhere Ak-Konzentrationen führen zu stärkerer Aggregation der Latexteilchen und verringern so die Diffusionkonstante D: die Linienbreite der ACF wird größer.

1) BSA-beschichtete Latexteilchen mit einem Durchmesser von d = 0,357 um wurden in Essigsäure-NaOH-Puffer (pH = 5,4; I = 0,1) derart verdünnt, daß pro Milliliter noch $10^6$ Teilchen enthalten waren: c = $10^6$ part./ml.

2) Diese Teilchen wurden dreißig Sekunden lang mit Ultraschall zur Beseitigung unspezifischer Aggregate behandelt (Kap. 3.1.1.1).

3) Eine Verdünnungsreihe der o.a. Antikörpercharge gegen BSA wurde angesetzt, beginnend mit einer Anfangskonzentration von 2.048 ng AS/ml. Die Verdünnung erfolgte in 2er-Schritten, d.h. der Verdünnungsfaktor betrug 1:2. Die Pufferlösung, die zur Verdünnung verwendet wurde, entsprach der unter Punkt 1) genannten.

4) Jeweils 500 ul der AS-Verdünnung und 500 ul der Latexteilchen (Punkt 1) wurden in Eppendorf-Röhrchen inkubiert. Daraus errechneten sich folgende Konzentrationen pro ml Ansatz:

   a) cPLS = 5 x $10^5$ part./ml konstant für jede Probe
   b) AS = 1.024 ng/ml usw. jew. 1:2

   Das Ansatzvolumen betrug demzufolge genau 1 ml je Probe. Die Inkubationszeit betrug 12 Stunden, die Inkubationstemperatur 4°C.

5) Im Anschluß an die Inkubation wurden die Ansätze im Wasserbad bei 20°C erwärmt, gründlich aber sehr vorsichtig aufgeschüttelt (cave Schaumbildung) und in der oben erwähnten Rundküvette (Kap. 3.1.1.1) mit einem Durchmesser von 8,1 mm gemessen. Die Wellenlänge des Lasers betrug 488,0 nm, der Meßwinkel $\theta = 60^\circ$. Die Messungen erfolgten unter homodynen Bedingungen.

Die Auswertung der Streulichtsignale erfolgte über die Autokorrelationsfunktion und ein speziell für diesen Zweck ausgearbeitetes Computerprogramm, das die Halbwertszeit $\tau_A$ der Autokorrelationsfunktion, sowie die Diffuions-Konstante D nach Gl. 23 bestimmte.

Diese Versuchsreihe wurde sechsmal wiederholt. Die Mittelwerte der Diffusions-Konstanten D sind in Abb. 11, Kurve a, gegen den Logarithmus der Proteinkonzentration des Antiserums aufgetragen. $c_o$ bedeutet die AS-Konzentration der ersten Probe mit dem höchsten Proteingehalt. In diesem Falle entsprach $c_o$ = 1.024 ng AS/ml Ansatz. Zur Beurteilung der gewonnenen Ergebnisse siehe Kap. 3.1.4. Elektrophorese-Messungen mit diesem Ansatz wurden nicht vorgenommen.

### 3.1.2 LATEX-DIFFUSIONS-TEST MIT HUMAN-SERUM-ALBUMIN (HSA)

Die Untersuchungen zum Immunsystem HSA - Antiserum gegen HSA waren ausführlicher und umfangreicher als diejenigen mit BSA. Hier wurden die Proben nicht nur auf ihre Diffusions-Konstante D untersucht, sondern auch vergleichende Trübungsmessungen und Kontrollmessungen mit unspezifischem Serum vorgenommen. Außerdem wurde die Ag-Ak-Reaktion auch im elektrischen Feld als Latex-Elektrophorese-Test durchgeführt.

#### 3.1.2.1 EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER VERSUCHSBEDINGUNGEN AUF DIE DIFFUSIONSKONSTANDE D

Auch die mit Human-Serum-Albumin beschichteten Teilchen wurden zunächst in einer Verdünnungsreihe getestet. Teilchen aller Größen (Tab. 4) wurden - wie in Kap. 3.1.1.1 beschrieben - in verschiedenen Konzentrationen gemessen.

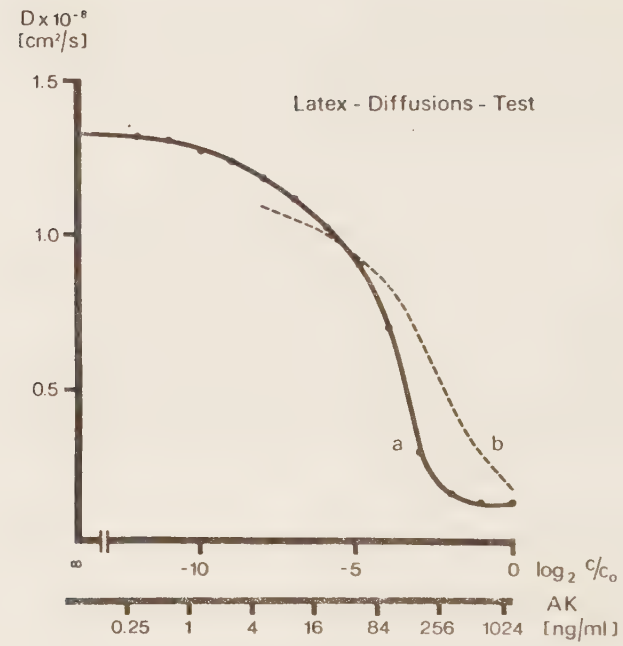



Abb. 11: Abhängigkeit der Diffusionskonstanten D von der Konzentration des Antiserums bei konstant gehaltener Anzahl BSA-beschichteter Latexteilchen von 5 x $10^5$ part./ml.
Kurve a: eigene Messungen
Kurve b: Messungen von Cohen und Benedek (15)

Die Verdünnungsschritte reichten von $10^{10}$ part./ml bis hinunter zu $10^{3}$ part./ml. Als Puffermedium diente ein Tris-HCl-Puffer (pH = 8,4; I = 0,2). Die Versuchsbedingungen glichen weit- gehend denjenigen bei Rinder-Serum-Albumin:

a) es wurde ein Ar-Laser benutzt ( $h_o$ = 488,0 nm),
b) es bestanden homodyne Meßbedingungen,
c) der Meßwinkel betrug $\theta = 60^{o}$,
d) die Proben wurden vor der Messung mit Ultraschall behandelt.

Lediglich die Meßzelle wurde ausgetauscht bzw. durch eine andere ersetzt. Als Meßküvette diente jetzt eine rechteckige Photometerküvette aus Normalglas mit einem Querschnitt von 1 cm x 1 cm. Das Probenvolumen betrug bei jeder Messung 2 ml. Die Zelle wurde um den halben Meßwinkel $\theta$ gegen den Laserstrahl nachgeführt, so daß der Versuchsaufbau den Bedingungen der Gl. 46 entsprach.

Auch bei diesen Versuchen wurde die Meßküvette als Schutz vor äußeren Störeinflüssen mit einem Deckel verschlossen und stand vor jeder Messung erschütterungsfrei auf der Meßplatte des Goniometertisches.

Genau wie bei den Versuchen mit BSA-beschichteten Teilchen blieb der Mittelwert der Diffusions-Konstanten D über den gesamten Meßbereich von $10^{3}$ part./ml bis $10^{10}$ part./ml auf einem konstanten Niveau. Dieses lag jedoch gegenüber den Teilchen, die mit BSA beschichtet waren, um 10-20 % höher. Die Standardabweichungen vom Mittelwert entsprachen in etwa denjenigen der Abb. 9. Den wertmäßigen Vergleich beider Meßreihen zeigt Tab. 10.

Zur Klärung der Frage, ob dieses Verhalten die höhere Diffusions-Konstante der HSA-beschichteten Teilchen auf die

Tabelle 10

| | Ø = 0,176 um | | | Ø = 0,357 um | | | Ø = 0,794 um | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Teilchen-konzentr. | $\bar{D}_{BSA}$ | $\bar{D}_{HSA}$ | $\bar{D}$ | $\bar{D}_{BSA}$ | $\bar{D}_{HSA}$ | $\bar{D}$ | $\bar{D}_{BSA}$ | $\bar{D}_{HSA}$ | $\bar{D}$ |
| part./ml | x $10^{-8}$ $cm^2/s$ | | % | x $10^{-8}$ $cm^2/s$ | | % | x $10^{-8}$ $cm^2/s$ | | x |
| $10^3$ | 2,61 | 3,05 | +17,2 | 1,21 | 1,43 | +18,2 | 0,65 | 0,72 | +10,8 |
| 2 x $10^3$ | 2,63 | 3,03 | +15,2 | 1,21 | 1,40 | +15,7 | 0,62 | 0,69 | +11,3 |
| $10^4$ | 2,60 | 2,99 | +15,0 | 1,20 | 1,41 | +17,5 | 0,66 | 0,74 | +12,1 |
| 2 x $10^4$ | 2,61 | 3,04 | +16,5 | 1,22 | 1,40 | +14,8 | 0,62 | 0,72 | +16,1 |
| $10^5$ | 2,60 | 3,10 | +19,2 | 1,18 | 1,42 | +20,3 | 0,62 | 0,68 | + 9,7 |
| 2 x $10^5$ | 2,58 | 3,06 | +18,6 | 1,20 | 1,39 | +15,8 | 0,63 | 0,71 | +12,7 |
| $10^6$ | 2,60 | 3,06 | +17,7 | 1,20 | 1,38 | +15,0 | 0,61 | 0,70 | +14,8 |
| 2 x $10^6$ | 2,62 | 3,10 | +18,3 | 1,20 | 1,41 | +17,5 | 0,60 | 0,71 | +18,3 |
| $10^7$ | 2,60 | 3,08 | +18,5 | 1,23 | 1,37 | +11,4 | 0,64 | 0,72 | +12,5 |
| 2 x $10^7$ | 2,58 | 3,04 | +17,8 | 1,21 | 1,39 | +14,9 | 0,62 | 0,73 | +17,7 |
| $\bar{x}$ = | 2,60 | 3,06 | +17,7 | 1,20 | 1,40 | +16,7 | 0,63 | 0,71 | +12,7 |
| | | | | | | | | | |
| $10^8$ | 2,57 | 2,98 | +16,0 | 1,17 | 1,38 | +17,9 | 0,60 | 0,70 | +16,7 |
| 2 x $10^8$ | 2,53 | 2,03 | +19,8 | 1,12 | 1,34 | +19,6 | 0,64 | 0,74 | +15,6 |
| $10^9$ | 2,52 | 2,89 | +14,7 | 1,16 | 1,40 | +20,7 | 0,51 | 0,66 | +29,4 |
| 2 x $10^9$ | 2,64 | 2,86 | + 8,3 | 1,33 | 1,38 | + 3,8 | 0,54 | 0,59 | + 9,3 |
| $10^{10}$ | 2,42 | 2,76 | +14,1 | 1,14 | 1,29 | +13,2 | 0,30 | 0,48 | +60,0 |

Mittelwerte der Diffusionskonstanten D für Verdünnungsreihen Albumin-beschichteter Latexteilchen unterschiedlicher Durchmesser:

Die Werte für Konzentrationen größerer 2 x $10^7$ Teilchen/ml wurden nicht für die Mittelwerte der Diffusionskonstanten D verwendet, da bei diesen Werten konzentrationsabhängige Veränderungen der Diffusionskonstanten auftreten und außerdem in keinem der folgenden Versuche eine Latexkonzentration von 2 x $10^7$ part./ml überschritten wird.

$\bar{D}$ bedeutet den Quotienten $\bar{D} = 100 \left(\frac{\bar{D}_{HSA}}{\bar{D}_{BSA}} - 1\right)$ %

Verwendung einer anderen Küvette und somit einer anderen Streugeometrie zurückzuführen war oder andere Ursachen hatte, wurde je eine Probe aller drei Latexchargen mit der in Kap. 3.1.1.1 verwendeten runden Glasküvette (Durchmesser 8,1 mm) gemessen. Auch diese Werte lagen rund 18 % über dem Niveau BSA-beschichteter Teilchen.

Die Art der Meßküvette und das Meßvolumen haben offensichtlich keinen Einfluß auf das dynamische Verhalten der Probe. Voraussetzung ist eine saubere Trennung von homodynen und heterodynen Meßbedingungen.

Faßt man die Werte der Tab. 10 zusammen, so ergibt sich für die Teilchen mit 0,176 um eine mittlere Diffusionskonstante von $D = 3{,}00 \times 10^{-8}$ cm$^2$/s, für diejenigen mit einem Durchmesser von 0,357 um ergibt sich $D = 1{,}39 \times 10^{-8}$ cm$^2$/s für diejenigen mit 0,794 um ergibt folgt $D = 0{,}69 \times 10^{-8}$ cm$^2$/s. Die durchschnittliche Erhöhung der Diffusionskonstanten HSA-beschichteter Teilchen gegenüber derjenigen BSA-beschichteter Teilchen liegt für alle Latexgrößen zwischen 15,8 % und 16,9 %.

Eine Erklärung für die höhere Wanderungsgeschwindigkeit steht noch aus. Eine "dickere" Albuminbeschichtung durch HSA widerlegen die Proteinbestimmungen beim Beschichtungsverfahren von Kap. 2.2.

### 3.1.2.2 HSA-IMMUNO-ASSAY

In den folgenden Versuchen soll gezeigt werden, daß mit Hilfe der Laser-Doppler-Spektroskopie ein qualitativer und quantitativer Nachweis spezifischer HSA-Antikörper möglich ist.

Die Versuche wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

1) HSA-beschichtete Teilchen mit einem Durchmesser von 0,357 um wurden in Tris-HCl-Puffer (pH = 8,4; I = 0,2) derart verdünnt, daß pro Milliliter Lösung noch $2 \times 10^6$ Teil- chen enthalten waren:
   $c = 2 \times 10^6$ part./ml.

2) Die Teilchen wurden 30 Sekunden lang mit Ultraschall zur Beseitigung unspezifischer Aggregate beschallt.

3) Eine Verdünnungsreihe der o.a. Antikörper-Charge gegen HSA wurde angesetzt, beginnend mit einer Anfangskonzentration von 2.880 ng Antiserum/ml Lösung. Der Verdünnungsfaktor von Probe zu Probe betrug 1:2. Die Pufferlösung entsprach der unter Punkt 1) genannten. Das Ansatzvolumen pro Verdünnungsschritt belief sich auf 6 ml. 2 ml davon wurden für photometrische Kontrollmessungen benötigt.

4) Jeweils 500 ul der Antiserum-Verdünnung (Punkt 3) und 500 ul der beschichteten Latexteilchen (Punkt 1) wurden in verschließbaren Eppendorf-Röhrchen inkubiert. Von diesem Reaktionsansatz wurden sechs Parallelansätze hergestellt. Drei Ansätze dienten für Parallelmessungen der Diffusionskonstanten D, die drei anderen für photometrische Vergleichsmessungen. Das Ansatzvolumen für jede Einzelprobe betrug 1 ml.

Die endgültige Konzentration im Meßansatz ergab sich pro Milliliter Ansatz als:

| | | | |
|---|---|---|---|
| a) cPLS | = | $10^6$ part./ml | konstant für jede Probe |
| b) AS | = | 1440 ng/ml | usw. jeweils 1:2 |

Die Inkubationszeit dauerte 12 Stunden, die Inkubationstemperatur 4°C.

5) Nach der Inkubation wurden die Ansätze im Wasserbad auf 20°C erwärmt und gründlich, aber unter Vermeidung von Schaumbildung, aufgeschüttelt.

6) Jeweils drei Parallelmessungen jeder Verdünnungsstufe wurden in der in Kap. 3.1.2.1 erwähnten rechteckigen Küvette (Grundfläche 1 cm x 1 cm) mit der Laser-Doppler-Spektroskopie gemessen. Die Wellenlänge des Lasers betrug $h_o$ = 488,0 nm, der Meßwinkel $\theta$ = 60°C. Die Messungen erfolgten unter homodynen Bedingungen.

7) Jeweils drei weitere Proben jeder Verdünnungsstufe, die mit denjenigen von Punkt 6 identisch sind, wurden für photometrische Vergleichsmessungen (s.u.) verwendet.

Aus der experimentell bestimmten Halbwertszeit $\tau_A$ und der Gl. 21 läßt sich die Diffusionskonstante D schnell berechnen.

Die Mittelwerte D der Diffusionsmessungen sind in Abb. 12 A gegen den Logarithmus der Proteinkonzentration des Antiserums aufgetragen, $c_o$ bedeutet die Antiserum-Konzentration der ersten Probe mit dem höchsten Proteingehalt. Für dieses Beispiel galt: $c_o = 1.440 \times 10^3$ ng AS/ml Ansatz. Die in Abb. 12 A gezeichneten Mittelwerte sind in Tab. 11 zusammengestellt.

Die photometrischen Vergleichsmessungen, durchgeführt an einem Shimadzu-Double-Beam-Photospektrometer (Modell UV-200 mit Saphir-Küvetten) bei 277,5 nm, sind ebenfalls in Tab. 11 protokolliert. Gemessen wurden die Extinktionen jeder Verdünnungsstufe gegen den o.a. Tris-HCl-Puffer als Leerwert. In Abb. 12 B, Kurve a sind diese Werte graphisch dargestellt.

Tabelle 11

| $-\log_z c/c_o$ | $AK_{(HSA)}$ ng/ml | $\bar{D} \times 10^{-8}$ $cm^2/s$ | Ext. $\bar{E}$ mit cPLS | Ext. $\bar{E}$ ohne cPLS |
|---|---|---|---|---|
| 0 | $1.440 \times 10^3$ | 1,05 | 1,820 | 1,592 |
| 1 | $720 \times 10^3$ | 1,00 | 0,322 | 0,300 |
| 2 | $360 \times 10^3$ | 1,02 | 0,198 | 0,146 |
| 3 | $180 \times 10^3$ | - | 0,080 | 0,066 |
| 4 | $90 \times 10^3$ | 0,60 | 0,044 | 0,014 |
| 5 | $45 \times 10^3$ | 0,61 | 0,048 | |
| 6 | $22,5 \times 10^3$ | 0,50 | 0,132 | 0,002 |
| 7 | $11,3 \times 10^3$ | 0,10 | 0,076 | |
| 8 | $5,6 \times 10^3$ | 0,17 | 0,050 | 0,009 |
| 9 | $2,8 \times 10^3$ | - | 0,020 | |
| 10 | $1,4 \times 10^3$ | 0,14 | 0,024 | |
| 11 | 700 | - | 0,030 | |
| 12 | 350 | 0,16 | 0,010 | |
| 13 | 175 | 0,31 | 0,074 | |
| 14 | 87,5 | 0,51 | 0,020 | 0,002 |
| 15 | 43,8 | 0,77 | 0,042 | |
| 16 | 21,9 | 0,98 | 0,016 | |
| 17 | 10,9 | 1,12 | 0,020 | |
| 18 | 5,5 | 1,22 | 0,018 | |
| 19 | 2,7 | 1,29 | 0,022 | |
| 20 | 1,4 | 1,35 | 0,019 | |
| 21 | 0,7 | 1,41 | 0,028 | |
| 22 | 0,35 | 1,43 | 0,021 | |
| 23 | 0,18 | 1,43 | 0,024 | |
| cPLS (0,357 um) | 0,00 | 1,42 | 0,051 | - |

Werttabelle der Vergleichsmessungen von Diff.-Konstante D und Extinktion E der photometrischen Messungen identischer Proben. $cPLS_{(HSA)}$ - AS gegen HSA

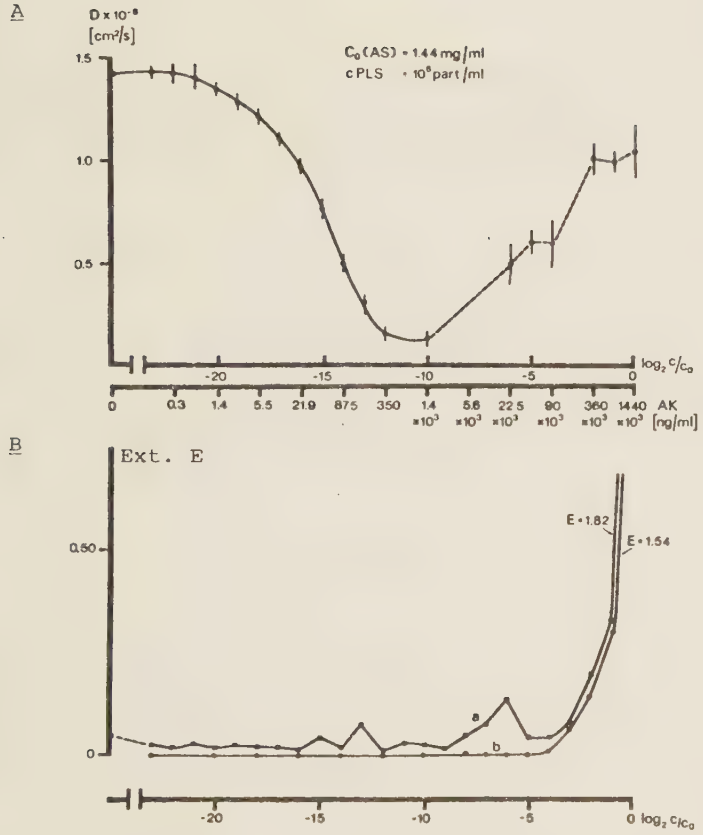



Abb. 12: Diffusionskonstante D als Funktion der Antiserumkonzentration (AS gegen HSA) bei konstanter cPLS-Konzentration von $1o^6$ part./ml (12 A)

Photometrische Vergleichsmessungen derselben Ansätze (12 B).

Als Kontrolle der photometrischen Messungen dienten je zwei Messungen à 1 ml pro Verdünnungsstufe ohne cPLS-Zusatz (Punkt 3 des Versuchsschemas). Kurve b der Abb. 12 B zeigt den graphischen Verlauf der gemessenen Werte.

### 3.1.3 LATEX-ELEKTROPHORESE-TEST MIT HUMAN-SERUM-ALBUMIN (HSA)

Alle folgenden Experimente wurden mit der Elektrophoresekammer, die in Abb.4 beschrieben ist, durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 3 schematisch wiedergegeben. Die Kapillare der Meßzelle hatte bei allen Versuchen eine Länge von 20,5 $\pm$ 0,5 mm und zwar mit Methylzellulose beschichtet (Kap. 2.5).

Die Versuche wurden wie folgt durchgeführt:

1) HSA-beschichtete Teilchen mit einem Durchmesser von 0,357 um wurden so verdünnt, daß pro Milliliter Lösung noch $10^7$ part./ml enthalten waren. Als Verdünnungsmedium diente ein Tris-HCl-Puffer (pH = 8,7; I = 0,005). cPLS = $10^7$ part./ml.

2) Die Teilchen wurden 30 Sekunden lang mit Ultraschall behandelt (Kap. 3.1.1.1).

3) Eine Verdünnungsreihe der o.a. Antikörper-Charge gegen HSA wurde angesetzt, beginnend mit einer Anfangskonzentration von 21,4 x $10^3$ ng/ml Lösung. Der Verdünnungsfaktor betrug von Probe zu Probe 1:2. Die Pufferlösung entsprach der unter Punkt 1) genannten. Das Ansatzvolumen für jeden Verdünnungsschritt betrug 2 ml.

4) Jeweils 500 ul der AS-Verdünnung (Punkt 3) und 500 ul der beschichteten Latexteilchen (Punkt 1) wurden für 12 Stunden bei $4^{o}C$ in verschließbaren Eppendorf-Röhrchen inkubiert. Jeder Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 1 ml. Die Konzentrationen in den Meßansätzen ergaben folgende Werte:

   a) cPLS = $5 \times 10^{6}$ part./ml konstant für jede Probe
   b) AS = $10,7 \times 10^{3}$ ng/ml usw. jeweils 1:2

5) Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionsansätze im Wasserbad auf $20^{o}C$ erwärmt und anschließend vorsichtig durchmischt.

6) Je zwei Parallelmessungen jeder Verdünnungsstufe wurden in der Meßküvette nach Abb. 4 gemessen. Die Wellenlänge des Lasers betrug $h_{o}$= 488,0 nm, der Meßwinkel $\theta = 15^{o}$. Die Meßzelle wurde um den halben Meßwinkel $\theta$ nachgeführt, so daß die Bedingungen der Gl. 46 erfüllt waren. Die Kapillare hatte eine Länge von 20,0 mm, die angelegte Spannung betrug 50 V/cm. Die Meßbedingungen entsprachen der heterodynen Technik.

Die Streulichtanalyse erfolgte mit einem für die Belange der Elektrophorese modifizierten Computerprogramm. Experimentell bestimmt wurde das um die Dopplerfrequenz $f_{D}$ (Kap. 2.1.8.1) verschobene "power"-Spektrum des Streulichts.

Ist diese Doppler-"shift" bestimmt, läßt sich nach Gl. 31 leicht die Mobilität der Teilchen berechnen. Die Wellenlänge ist in diesem Falle in Mikrometer-Einheiten anzugeben!

Weiter errechnet sich nach Gl. 25 auch die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit $\bar{v}$ der zu messenden Teilchen. Wie schon in Kap. 2.1.8.1 beschrieben, sind die

Mobilität $\mu$ und die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit $\bar{v}$, die einander direkt proportional sind, ein geeigneter Parameter zur Bestimmung von Ag- bzw. Ak-Konzentrationen entsprechender Lösungen.

Vor der systematischen Messung der o.a. Verdünnungsreihe wurde ein Screening-Test mit unterschiedlichen AS-Konzentrationen pro ml Ansatz durchgeführt. Abb. 13 zeigt die Frequenzverschiebung $f_D$ der zugehörigen "power"-Spektren. Mit steigender Antikörperkonzentration läßt sich ein deutlicher Abfall der Doppler-"shift" nachweisen.

Anschließend wurden die oben beschriebenen Verdünnungsreihen gemessen. Als Leerwert dienten HSA-beschichtete Latexteilchen ohne AS-Zusatz ( cPLS = $5 \times 10^6$ part./ml). In Tab. 12 sind die Mittelwerte (n = 2) der gemessenen Dopplerfrequenzen $f_D$ und der Wanderungsgeschwindigkeiten $\bar{v}$ aufgelistet. Abb. 14 zeigt den graphischen Verlauf der entsprechenden Werte.

Um festzustellen, welchen Einfluß die Konzentration der beschichteten Latexteilchen auf die Wanderungsgeschwindigkeiten der Teilchen besitzt, wurde diese unter sonst gleichen Versuchsbedingungen variiert. Drei weitere Versuchsreihen mit folgenden Latexkonzentrationen wurden durchgeführt:

a) cPLS = $5 \times 10^4$ part./ml
b) cPLS = $5 \times 10^5$ part./ml
c) cPLS = $5 \times 10^7$ part./ml.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigt Abb. 15.

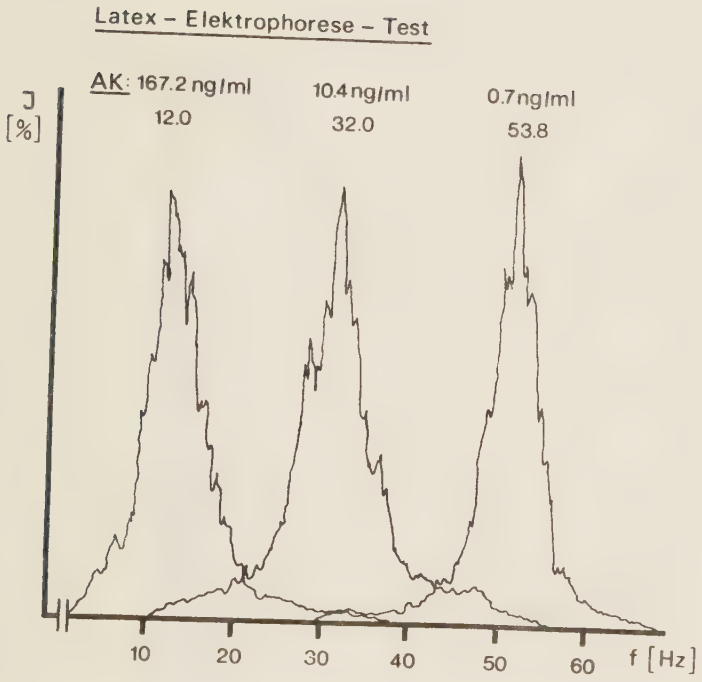



Abb. 13: Screening-Test zum Nachweis von HSA-Antikörpern. Verschiedene Ak-Konzentrationen wurden mit einer konstanten Menge ($5 \times 10^6$ part./ml) HSA-beschichteter Latexteilchen inkubiert und die Dopplerfrequenz $f_D$ experimentell bestimmt.
$h_o = 632{,}8$ nm ; $\Theta = 15^o$ ; E = 50 V/cm

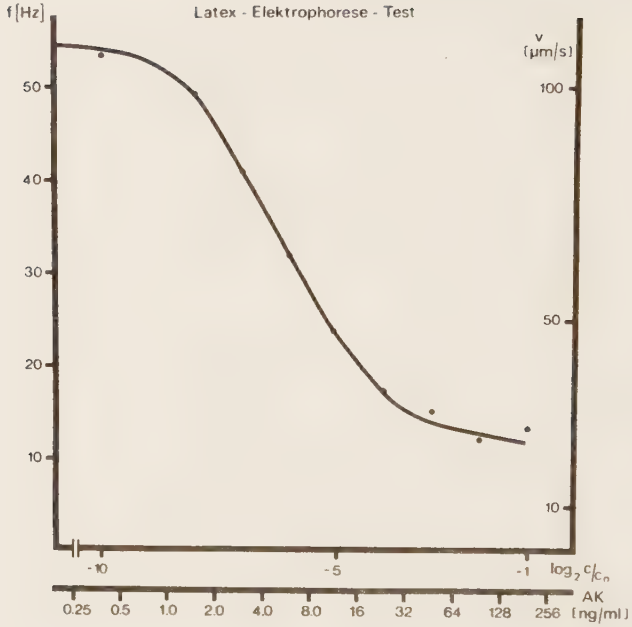



Abb. 14: Abhängigkeit der Dopplerfrequenz $f_D$ und der elektrischen Wanderungsgeschwindigkeit $\bar{v}$ von der Ak-Konzentration bei konstanter Menge ($5 \times 10^6$ part./ml) HSA-beschichteter Latexteilchen.

$h_o = 632{,}8$ nm ; $\Theta = 15^o$ ; E = 50 V/cm

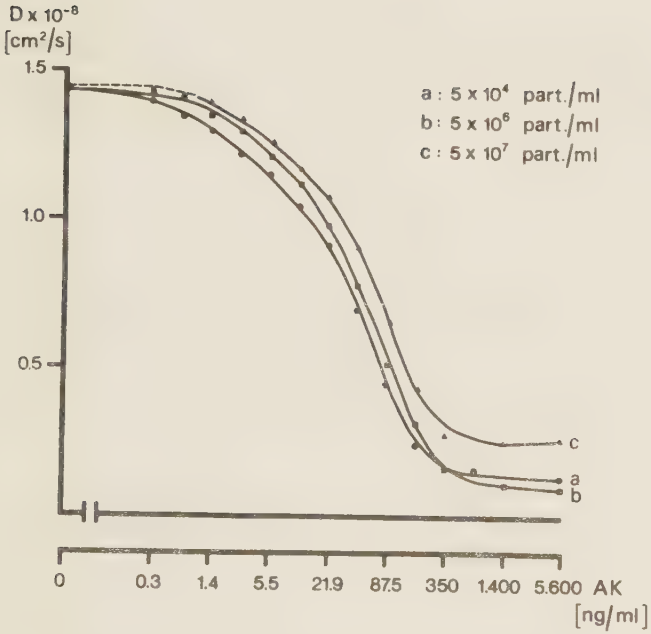



Abb. 15: Empfindlichkeit des Latex-Diffusions-Tests in Abhängigkeit von der Latexkonzentration am Beispiel HSA-beschichteter Latexteilchen.
Bei dieser Versuchsanordnung erhält man nahezu identisch velaufende, parallel gegeneinander verschobene Kurven. Je geringer die Anzahl der beschichteten Latexteilchen pro Volumeneinheit gewählt wird, desto größer wird die Empfindlichkeit des Tests. Der Meßbereich liegt für cPLS zwischen 5 x $1o^4$ und 5 x $1o^7$ part./ml. Die zugehörigen unteren Nachweisgrenzen für Ak von o,35 ng/ml und 1,2 ng/ml geben den Bereich an, in dem die Testempfindlichkeit variiert werden kann. Die Variationsbreite liegt also etwa bei einem Faktor von etwa 3.

### 3.1.4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die vorliegenden Versuche zeigen, daß die Laser-Doppler-Spektroskopie eine gute Möglichkeit bietet, selbst geringe Antigen- bzw. Antikörperkonzentrationen im ng-Bereich in wäßrigen Lösungen zu bestimmen.

Vorversuche zu den jeweiligen Versuchsreihen der Diffusionsmessungen zeigten, daß die Konzentration der Latexteilchen ohne Zusatz von Antiserum innerhalb gewisser Grenzen keinen Einfluß auf die Diffusionskonstante D besitzt (Abb. 9). Ebenso konnte kein Unterschied bei den verwendeten Puffermedien festgestellt werden. Die pH-Werte dieser Lösungen lagen zwischen 5,4 und 8,6, die Ionenstärken zwischen 0,005 und 0,2 (Kap. 3.1.1.1 und 3.1.2.1).

Diese Konstanz der Diffuionsmessungen Albumin-beschichteter Latexteilchen stimmt auch gut mit den Messungen von Raj und Flygare (54) überein, die die Abhängigkeiten von Ionenstärke, pH-Wert und Albuminkonzentration auf die Diffusionskonstante untersucht haben. Allerdings haben Raj und Flygare reine 1 %ige BSA-Lösungen ohne "carrier"-Partikel beschrieben; ein direkter Vergleich beider Messungen ist daher leider nicht möglich. Sie berichteten, daß Ionenstärke und pH-Wert keinen Einfluß auf die Diffusions-Konstante D besitzen, solange der pH-Wert den isoelektrischen Punkt von BSA ($I.P._{(BSA)} = 4,9$) nicht unterschreitet.

Wie schon in den Kapiteln 3.1.1.1 und 3.1.2.1 berichtet wurde, lagen die besten Streulichtsignale bei Latexkonzentrationen zwischen $10^5$ part./ml und $10^7$ part./ml.

Dies wurde bei den Reaktionsansätzen berücksichtigt: im BSA-Immuno-Assay lag die Teilchenkonzentration bei $5 \times 10^5$ part./ml, im HSA-Immuno-Assay bei $10^6$ part./ml Ansatz.

Die Abb. 11 und 12 A zeigen den Abfall der Diffusions-Konstanten D bei zunehmender AS-Konzentration. Im BSA-System läßt sich eine deutliche Aggregation der Teilchen feststellen zwischen ca. 3 ng AS/ml und 300 ng AS/ml, im HSA-System etwa zwischen 0,6 ng/ml und 350 ng/ml. Untersuchungen mit höheren Antiserum-Konzentrationen ergaben, daß die kleinste Diffusionskonstante D, d.h. die höchste Aggregationsstufe der Teilchen für mehr als fünf Verdünnungsschritte konstant bleibt. Das bedeutet immerhin eine Konstanz der Teilchengröße über einen Bereich von etwa 11.000 ng AS/ml (300 ng bis 11.200 ng/ml) entsprechend einem Faktor von 36 bis 37.

Bei höheren Antikörper-Konzentrationen steigt die Diffusions-Konstante stufenweise unter gleichzeitiger Vergrößerung der Standardabweichungen wieder an, um ab Antiserum-Konzentrationen von 360.000 ng/ml aufwärts einen Wert von ungefähr $D = 1{,}02 \times 10^{-8}$ $cm^2/s$ zu erreichen (Abb. 12 A).

Dieser Effekt läßt mehrere Deutungen zu:

1) es handelt sich um einen spezifischen Effekt mit einem Reaktionsmaximum bei $c = 1{,}4 \times 10^3$ ng/ml oder

2) der Anstieg der Diffusions-Konstanten resultiert aus unspezifischen Serumeffekten bei hohen Protein-Konzentrationen.

Für die erste Möglichkeit sprechen theoretische Überlegungen zur Reaktionskinetik von Ag-Ak-Reaktionen und die Versuche zum Myosin-System (s. dieses), bei dem eindeutig ein Reaktionsmaximum nachgewiesen werden konnte. Für die zweite Möglichkeit sprechen die Versuche mit unspezifischem Kontrollserum, die Änderungen der Diffusions-Konstanten bei Proteinkonzentrationen größer $25 \times 10^3$ ng/ml verursacht haben.

Mit großer Wahrscheinlichkeit liegt eine Mischung beider Effekte vor, einer Überlagerung von spezifischen Ag-Ak-Reaktion mit einem definierten Reaktionsoptimum mit unspezifischen Serumeffekten, die bei hohen Proteinkonzentrationen eine Veränderung des dynamischen Verhaltens der beschichteten Teilchen verursachen können (z.B. Viskositätsänderungen). Eine Trennung beider Ursachen ist mit der Laser-Doppler-Spektroskopie z.Z. nicht möglich.

Des weiteren wurden im HSA-System Vergleichsmessungen mit photometrischen Methoden vorgenommen. Abb. 12 B zeigt, daß die gemessene Extinktion E im Bereich zwischen 0,3 ng/ml 90 x $10^3$ ng/ml weitgehend konstant bleibt, um dann bei Konzentrationen größer 90 x $10^3$ ng/ml steil anzusteigen (Kurve a der Abb. 12 B). Vergleichsmessungen mit einem unspezifischen menschlichen Serum zeigen, daß dieser steile Anstieg einen reinen unspezifischen Serumeffekt darstellt (Kurve b der Abb. 12 B), der nicht auf eine stattgefundene Immunreaktion schließen läßt.

Vergleicht man die Abb. 12 A und 12 B, stellt man fest, daß die Laser-Doppler-Spektroskopie - betreffend die Empfindlichkeit der Messungen - der Photometrie um Größenordnungen überlegen ist. Mit photometrischen Methoden läßt sich im Mikro- oder gar im unteren Nanogrammbereich im Albumin-System keine Immunreaktion nachweisen.

Auch Cohen und Benedek (15) konnten in diesem Konzentrationsbereich bei einem ähnlichen BSA-System durch Trübungsmessungen keine Ag-Ak-Reaktion nachweisen. Einen direkten Vergleich der Diffusionsmessungen von Cohen und Benedek (15) mit den eigenen Versuchswerten zeigt Abb. 11. Die Kurven haben einen prinzipiell gleichen Verlauf, doch liegt die untere Nachweisgrenze bei den eigenen Messungen durch Systemoptimierung etwa um den Faktor zehn günstiger,

das Auflösungsvermögen der Messungen ist bei beiden Autoren gleich: das Verhältnis von größter Diffusionskonstante zu kleinster Diffusionskonstante $D_{max.}$ / $D_{min.}$ beträgt bei Cohen und Benedek etwa 10:1, bei den eigenen Versuchen ungefähr 9,3:1.

Die oben schon erwähnten Kontrollmessungen wurden mit unspezifischem menschlichem Serum in der gleichen Weise wie mit Antiserum durchgeführt. Es konnte bei diesem System keine meßbare Änderung der Diffusionskonstanten festgestellt werden, solange die Serumkonzentration den Wert von $10 \times 10^3$ ng/ml nicht überstieg. Nahm die Konzentration weiter zu, fiel die Diffusionskonstante D, die vorher gleichbleibend bei etwa $1{,}3 \times 10^{-8}$ $cm^2/s$ lag, auf Werte um $0{,}8 \times 10^{-8}$ $cm^2/s$ ab. Für die Messung spezifischer Immunreaktionen bleibt also noch ein "Sicherheitsabstand" von gut $10 \times 10^3$ ng/ml erhalten. Das entspricht einem Faktor von $2^5$ bis $2^6$ Einheiten. Um diesen Sicherheitsbereich nicht zu verlassen, sollten in den Systemen mit Latexteilchen als Trägerpartikeln keine Messungen durchgeführt werden, bei denen die Proteinkonzentration größer als $5 \times 10^3$ ng/ml ist.

Nahm man die in den Abb. 12 A und 12 B gezeichneten Kurven als Standardkurven und verglich die Verdünnungsreihen von Antiserum mit unbekannter Anfangskonzentration $c_o$ mit dieser Standardkurve, war es möglich, diese unbekannte Anfangskonzentration $c_o$ des Antiserums zu bestimmen. Versuche mit mehreren unterschiedlichen Anfangskonzentrationen ergaben zufriedenstellende Resultate. Die mittlere Abweichung der experimentell ermittelten Konzentration $c_o$ von der tatsächlich in den Assay eingesetzten betrug weniger als 15 %.

Stillschweigende Voraussetzung dieser Experimente sind gleiche Affinitäten der Antikörper zu den Antigenen der bekannten sowie der unbekannten Versuchsreihe. Die Empfindlichkeit des Tests läßt sich - wie Abb. 15 zeigt - in gewissen Grenzen variieren. Setzt man in den Assay als konstante cPLS-Konzentration anstelle von $5 \times 10^6$ part./ml nur $5 \times 10^4$ part./ml ein, dann läßt sich die Empfindlichkeit des Tests etwa um den Faktor 2,5 steigern. Die Nachweisgrenze liegt dann bei 0,35 ng/ml. Allerdings muß bei dieser geringen Latexkonzentration ein Anstieg der Standardabweichungen auf Werte teils über +/- 15 % in Kauf genommen werden, da die geringe Streulichtmenge unspezifische Störungen (z.B. Staubteilchen) stärker zum Tragen kommen läßt. Im übrigen liegen die Nachweisgrenzen im HSA-System bei folgenden Werten:

1) $5 \times 10^4$ part./ml bei 0,35 ng AS/ml s = bis +/- 15 %
2) $5 \times 10^5$ part./ml bei 0,6 ng AS/ml s = bis +/- 6 %
3) $5 \times 10^6$ part./ml bei 0,8 ng AS/ml s = bis +/- 5 %
4) $5 \times 10^7$ part./ml bei 1,2 ng AS/ml s = bis +/- 8 %

Die zuverlässigsten Versuchswerte konnten mit $5 \times 10^5$ part./ml und $5 \times 10^6$ part./ml erzielt werden.

Mit dieser Nachweisempfindlichkeit ist die LDS dem Radio-Immuno-Assay und dem Enzym-Immuno-Assay zumindest ebenbürtig. Außerdem besteht keine Gefährdung des Laborpersonals durch radioaktiv markiertes Material. Ein weiterer Vorteil der Laser-Doppler-Spektroskopie ist die kurze Meßdauer, die je Einzelmessung nur ein bis zwei Minuten in Anspruch nimmt. Aber es gibt keine Methode ohne Nachteile: der Laser-Diffusions-Test erfordert äußerste Sauberkeit und Vermeidung jedweder kolloidalen Verunreinigungen der verwendeten Glaswaren und Lösungen,

da bei diesem Verfahren die Lichtstreuung in erster Linie von der Größe der Teilchen und nicht von der Oberflächenladung der Partikel abhängt. So kann zum Beispiel schon eine geringe Anzahl von Staubteilchen das Ergebnis einer Messung stark verfälschen. Außerdem ist der Test sehr empfindlich auf Erschütterungen, so daß ein qualitativ guter schwingungsgedämpfter Meßplatz notwendige Voraussetzung für zuverlässige Meßwerte darstellt. Im ganzen gesehen ist der Latex-Diffusions-Test daher störanfälliger als der Latex-Elektrophorese-Test.

Laut Uzgiris (69) soll die Meßempfindlichkeit bei der Elektrophorese noch höher liegen als bei der Diffusion. Dieser Befund konnte mit den vorliegenden Versuchen nicht bestätigt werden. Die unteren Nachweisgrenzen für die einzelnen Latexkonzentrationen beim Elektrophorese-Test (Abb. 16) lagen bei (Tab. 13):

1) $5 \times 10^4$ part./ml bei 0,5 ng AS/ml
2) $5 \times 10^5$ part./ml bei 1,0 ng AS/ml
3) $5 \times 10^6$ part./ml bei 2,5 ng AS/ml
4) $5 \times 10^7$ part./ml bei 5,2 ng AS/ml.

Die zuverlässigsten Werte liefern - ebenso wie bei der Diffusion - Proben mit einer cPLS-Konzentration von $5 \times 10^5$ part./ml bis $5 \times 10^6$ part./ml. Die Testempfindlichkeit ist gegenüber den Diffusionsmessungen etwa um den Faktor 1,5 schlechter. Dafür ist die Standardabweichung der einzelnen Meßwerte mit weniger als 0,5 % weitaus besser als bei den Diffusionsmessungen mit z.T. über 10 %. Auch die Reproduzierbarkeit der Elektrophoresemessungen ist eindeutig besser.

Untersuchungen zur Haltbarkeit der angesetzten Verdünnungsreihen zeigten, daß, wenn dieselben Proben am folgenden Tag

Tabelle 12

| Nr. der Probe | $-\log_2 c/c_o$ | AK ng/ml | $\bar{f}D$ Hz | Mobilität u $\frac{um \times cm}{V \times s}$ | $\bar{v} = u \times E$ um/s |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 | $10,7 \times 10^3$ | 14,0 | 0,51 | 25,5 |
| 2 | 1 | $5,4 \times 10^3$ | 15,2 | 0,55 | 27,5 |
| 3 | 2 | $2,7 \times 10^3$ | 13,4 | 0,49 | 24,5 |
| 4 | 3 | $1,3 \times 10^3$ | 11,0 | 0,40 | 20,0 |
| 5 | 4 | 669 | 14,2 | 0,52 | 26,0 |
| 6 | 5 | 334 | 19,2 | 0,70 | 35,0 |
| 7 | 6 | 167 | 29,0 | 1,06 | 63,0 |
| 8 | 7 | 83,6 | 37,8 | 1,38 | 69,0 |
| 9 | 8 | 41,8 | 44,8 | 1,63 | 81,5 |
| 10 | 9 | 20,9 | 47,6 | 1,74 | 87,0 |
| 11 | 10 | 10,4 | 40,2 | 1,47 | 73,5 |
| 12 | 11 | 5,2 | 52,0 | 1,90 | 95,0 |
| 13 | 12 | 2,6 | 52,2 | 1,90 | 95,0 |
| 14 | 13 | 1,3 | 53,2 | 1,94 | 97,0 |
| 15 | 14 | 0,65 | 52,6 | 1,92 | 96,0 |
| Leerwert | - | - | 52,2 | 1,90 | 95,0 |

Mittelwerte der Dopplerfrequenz $f_D$, der Mobilität u und der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit $\bar{v}$ im System cPLS$_{(HSA)}$ - AS gegen HSA

$c_{Latex} = 5 \times 10^6$ part./ml Ansatz (0,357 um)

$h_o = 632,8$ nm; E = 50 V/cm; Meßwinkel $\varnothing = 15^\circ$

Die Berechnung der Mobilität u erfolgte nach Gl. 31, die Berechnung der Wanderungsgeschwindigkeit v nach Gl. 25 (s. a. Abb. 16).

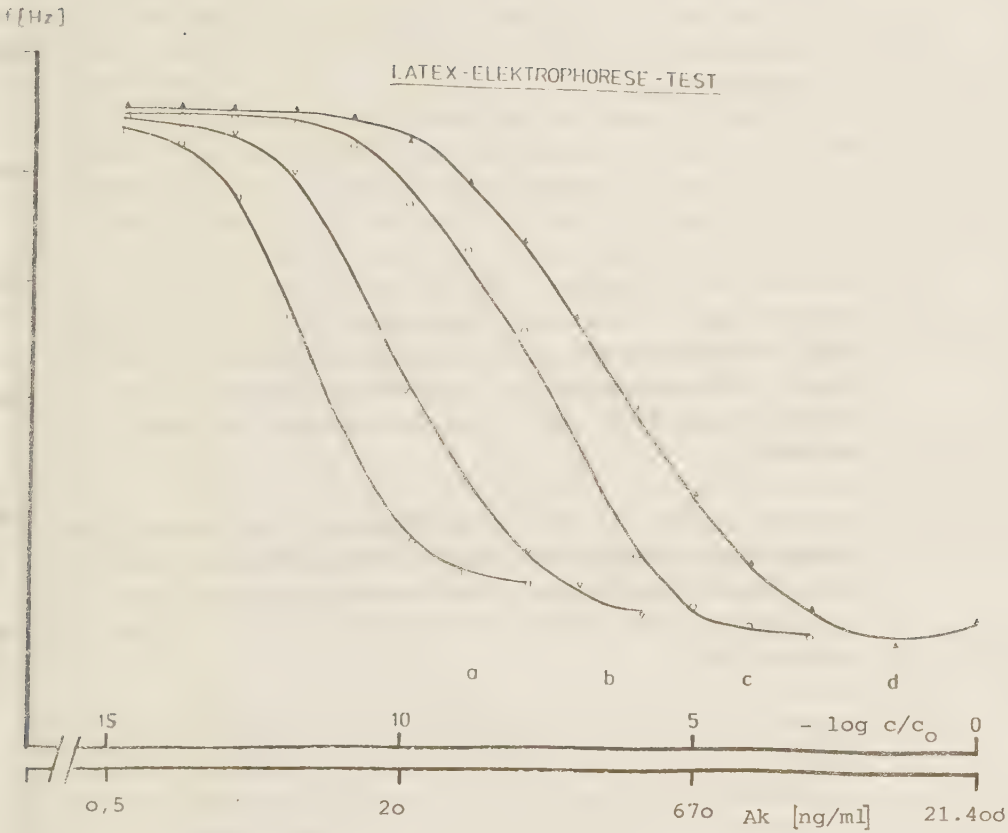



Abb. 16: Dopplerfrequenz $f_D$ als Funktion der Ak-Konzentration HSA-beschichteter Latexteilchen unterschiedlicher Konzentrationen:
Kurve a: 5 x 1o$^4$ part./ml
Kurve b: 5 x 1o$^5$ part./ml
Kurve c: 5 x 1o$^6$ part./ml
Kurve d: 5 x 1o$^7$ part./ml.
Diese Abbildung zeigt analog der Abb. 15 die Einstellmöglichkeit der Testempfindlichkeit des Latex-Elektrophorese-Tests.

gemessen, noch die gleichen Ergebnisse erzielt werden können wie am Vortag. Die Abweichung betrug weniger als 2 %. Messungen derselben Werte eine Woche später ergaben Einbußen der Meßempfindlichkeit des Tests der Größenordnung $2^3$ bis $2^4$, da die Proteine des Antiserums in den hohen Verdünnungsstufen denaturieren und offensichtlich ihre Hemmwirkung auf die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen verlieren. Die Meßwerte der Proben mit den höheren Proteinkonzentrationen blieben erhalten. Die Kurven fallen erst bei weitaus größeren AS-Konzentrationen ab. Dadurch wird der Meßbereich kleiner und die Kurve steiler. Das wiederum bedeutet ein geringeres Auflösungsvermögen des Tests. Die angesetzten Meßreihen sollten zur Erzielung zuverlässiger Werte spätestens am folgenden Tag gemessen werden.

Äußerst wichtig für die Vergleichbarkeit von Meßdaten beim Latex-Elektrophorese-Test sind konstante Meßbedingungen betreffend pH-Wert, Ionenstärke und das angelegte elektrische Feld, da diese drei Größen direkt in die Messung mit eingehen (63).

Kontrollmessungen mit unspezifischem menschlichem Serum ergaben keinen Abfall der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit $\bar{v}$ im Bereich unter 50.000 ng/ml. Lagen die Antiserum-Konzentrationen über diesem Wert, konnte ein Absinken der Dopplerfrequenz $f_D$ mit steigender Proteinkonzentration des Antiserums beobachtet werden. Doch auch hier - ebenso wie bei der Diffusion - war ein ausreichender "Sicherheitsabstand" gewährleistet.

Ob der Nachweis von Albumin-Antikörpern einmal praktische klinische Bedeutung erlangen wird, ist noch ungewiß. Sollte sich die Existenz von Albumin-Antikörpern bei gewissen Tumor- oder Autoimmunkrankheiten bewahrheiten, könnte dieser Test eine wertvolle diagnostische Hilfe werden.

## 3.2. LASER-DOPPLER-TEST FÜR DIGITOXIN

Der umfangreiche Einsatz von Herzglycosiden im medizinisch-klinischen Bereich erfordert wegen der relativ geringen therapeutischen Breite der Digitalispräparate eine möglichst genaue, an den Patienten angepaßte Dosierung der entsprechenden Medikamente. Neben der klinischen Überwachung der Patienten sollte eine regelmäßige Kontrolle der Blutserumspiegel stattfinden, um optimale Wirkkonzentrationen der Digitalispräparate am Herzen sicherzustellen. Das wiederum setzt eine schnelle, zuverlässige aber auch preiswerte Meßmethode für Herzglycoside voraus.

Im folgenden Kapitel werden Versuche geschildert, mit Hilfe der Laser-Doppler-Spektroskopie Digitoxinspiegel sowie Ak-Titer gegen BSA-Digitoxin in verschiedenen Lösungen zu bestimmen. Abb. 17 zeigt die Struktur- und Summenformeln der zwei klinisch wichtigsten Herzglycoside.

Dank der Hilfe von Priv.-Doz. Dr. U. Peters (Med. Klinik und Poliklinik A der Universität Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. W. Schneider), der einige Chargen selbst hergestellter Digitoxin-Antikörper sowie BSA-Digitoxin-Konjugat (52) zur Verfügung stellte, konnten die entsprechenden Versuche durchgeführt werden. Es wurden sowohl Diffusions- als auch Elektrophorese-Messungen der Ag- sowie der Ak-Konzentrationen durchgeführt.

### 3.2.1 LATEX-ELEKTROPHORESE-TEST ANTIKÖRPER-NACHWEIS

Als Materialien dienten die in Kap. 2.2.3 beschriebenen mit BSA-Digitoxin-Konjugat beschichteten Latexteilchen mit einem Durchmesser von 0,357 nm, die in einer Stammlösung in einer

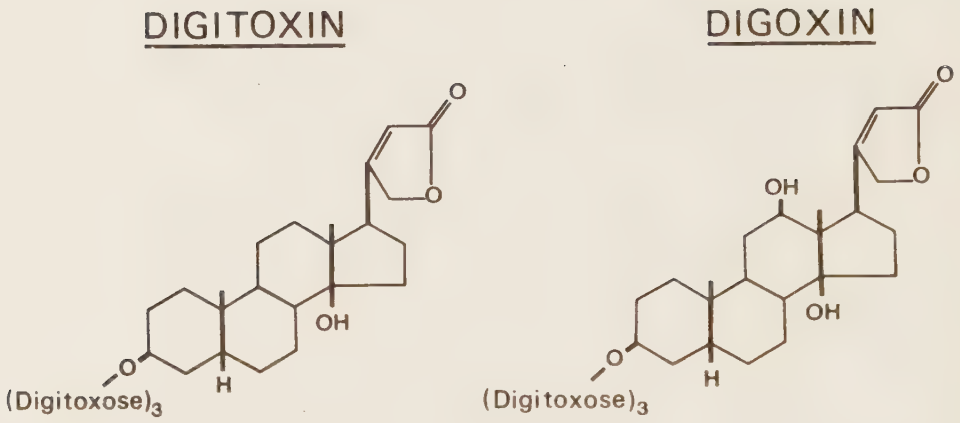



Abb. 17: Strukturformeln von Digitoxin und Digoxin

Konzentration von 9,3 x $10^{10}$ part./ml vorlagen sowie das von Peters (52) hergestellte Antiserum gegen BSA-Digitoxin.

Als Pufferlösung diente ein Phosphatpuffer mit pH = 7,42 und einer Ionenstärke von I = 0,0035. Der Meßwinkel $\theta$ betrug 15°. Für den Wellenkonvektor $\bar{K}$ galten die Bedingungen der Gl. 46. Die elektrische Feldstärke betrug E = +/- 50 V/cm, die Elektrophoresestrecke (Kapillare) hatte eine Länge von 20,0 mm.

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe des Antiserums hergestellt. Ausgehend von der höchsten Konzentration $c_o$ = 1:50 = 400 mg/ml Gammaglobulin-Anteil wurden die Proben jeweils 1:2 mit o.a. Phosphatpuffer verdünnt. Anschließend wurde zu jedem Verdünnungsschritt eine konstante Menge BSA-beschichteter Latexteilchen pipettiert, so daß sich in jedem Reaktionsansatz eine Latexkonzentration von $c_L$ = 5 x $10^6$ part./ml befand. Das Ansatzvolumen betrug 1,0 ml, die Inkubationszeit 90 min. bei 4°C. Diese Zeit sollte ausreichen, um ein Gleichgewicht der Ag-Ak-Reaktion zu erreichen (52, S. 25/26 und dort Abb. 15). Nach der Inkubation wurden die Proben im Wasserbad auf 20°C erwärmt und anschließend gemessen.

Die Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt. Es findet sich eine deutliche Abhängigkeit der Mobilität $\mu$ von der AS-Konzentration. Leider ergaben Kontrollmessungen mit menschlichem Kontrollserum (Kap. 2.2.6) einen nahezu identischen Kurvenverlauf, so daß unter diesen Versuchsbedingungen die Bestimmung einer unbekannten AS-Konzentration nicht möglich war.

Weitere Überlegungen führten zu der Annahme, daß die Zugabe von reinem BSA als Stabilisator zur Pufferlösung sich günstig auf die Ag-Ak-Reaktionen auswirken könnte. Nach

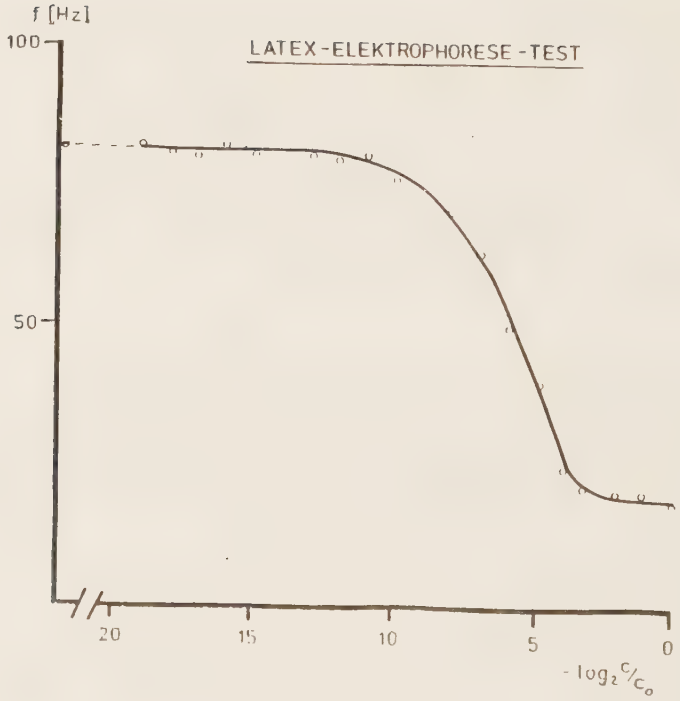



Abb. 18: Abhängigkeit der Dopplerfrequenz $f_D$ von der AS-Konzentration gegen BSA-Digitoxin-Konjugat. Bei diesem Versuchsaufbau (s. Text) zeigte die Kontrollkurve mit unspezifischem menschlichen Serum einen identischen Verlauf, so daß der gezeigte Frequenzabfall auf einen rein unspezifischen Serumeffekt zurückgeführt werden muß.

$c_o$: 1:5o des Original-AS gegen BSA-Digitoxin-Konjugat.

eigenen Versuchen beeinflußt die BSA-Zugabe nicht die Wanderungsgeschwindigkeiten der beschichteten Latexteilchen, sondern erzeugt lediglich einen zusätzlichen "peak", während sich die "peaks" des AS je nach Serumkonzentration wandern (Abb. 19).

Versuche mit einem Tris-HCl-Puffer (pH = 8,6, I = 0,005) mit und ohne BSA-Zusatz wurden durchgeführt. Die Reaktionskurven mit Albuminzusatz zeigten einen deutlich anderen Verlauf als diejenigen ohne Albuminzusatz (Abb. 20). Die BSA-Konzentration lag bei den entsprechenden Proben bei 1,9 % im Ansatz = 19 g/l. Doch auch hier ergab sich noch kein signifikanter Unterschied zwischen AS und unspezifischem Kontrollserum. Folgende Faktoren kamen für die schlechten Versuchsbedingungen in Betracht: pH-Wert, Ionenstärke, BSA-Konzentration, falsche Inkubationsbedingungen oder ein anderer noch nicht bekannter Umstand.

Die ersten Erfolge konnten mit einem Phosphatpuffer mit BSA-Zusatz erzielt werden. Der pH-Wert der Lösung betrug 7,3, die Ionenstärke I = 0,0035 und die Albuminkonzentration $c_o$ = 5 g/l im Ansatz. Die Inkubationszeit war auf 12 Stunden bei $4^oC$ verlängert worden.

Die Serumverdünnungsreihen begannen mit einer Verdünnung der jeweiligen Seren von 1:100, die cPLS-Konzentration lag konstant bei $5 \times 10^6$ part./ml Ansatz. Abb. 21 zeigt den Verlauf der Kurven für AS und für unspezifisches Kontrollserum. Die Abbildung zeigt einen deutlichen getrennten Verlauf der Kurven für beide Seren.

Deutlich verbessern ließen sich die Ergebnisse des vorigen Versuches durch die Einführung eines weiteren Schrittes im Versuchsablauf. Nach der Inkubation der beschichteten Latexteilchen mit der Serumverdünnung wurden die Proben nochmals

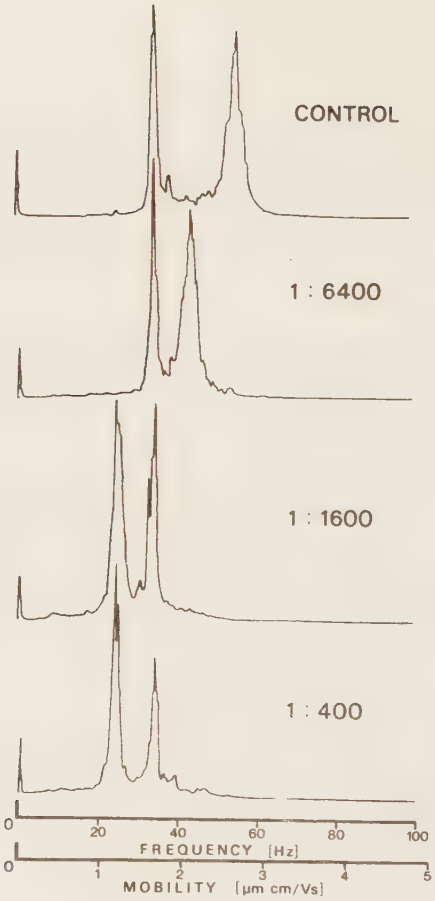



Abb. 19: BSA-Zugabe beeinflußt nicht die Wanderungsgeschwindigkeit beschichteter Latexteilchen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen des entsprechenden AS inkubiert wurden, sondern erzeugt nur einen zusätzlichen "peak", der sich konstant bei etwa 34 Hz befindet, während die "peaks" der Latexteilchen je nach der zugegebenen Serumkonzentration von 58 Hz bis hinunter zu 23 Hz wandern.

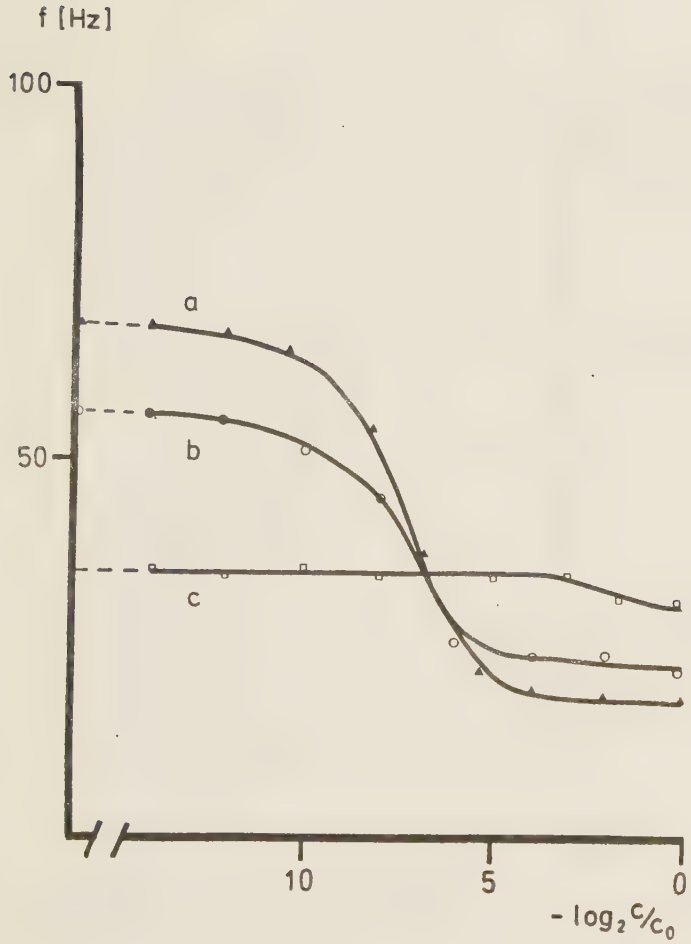



Abb. 2o: Abhängigkeit der Dopplerfrequenz $f_D$ von der AS-Konzentration gegen BSA-Digitoxin- Konjugat
a: ohne BSA-Zusatz
b: mit BSA-Zusatz von 19 g/l
c: zusätzliche "peaks" vom BSA-Überschuß der Kurve b

$c_o$: 1:25 des Original-AS

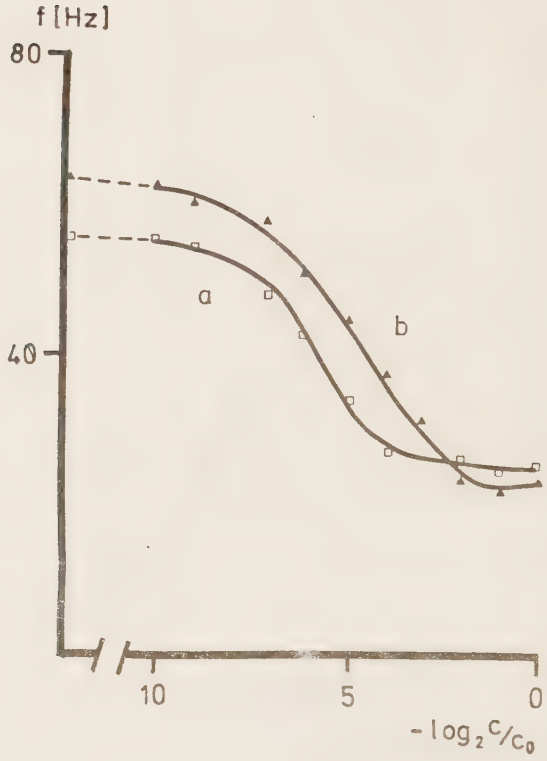



Abb. 21: Abhängigkeit der Dopplerfrequenz $f_D$ von der Serumkonzentration.
a: AS gegen BSA-Digitoxin-Konjugat
b: unspezifisches Kontrollserum

Beide Seren enthalten einen BSA-Zusatz von 5 g/l.

$c_o$: 1:4oo der Originalseren

je zweimal 10 Minuten bei 20.000 g in Phosphatpuffer gewaschen. Die Inkubationszeit konnte wieder auf drei Stunden bei $4^0$C reduziert werden. Die übrigen Versuchsbedingungen entsprachen denjenigen der in Abb. 21 beschriebenen Versuche. Abb. 22 zeigt den graphischen Verlauf der Meßergebnisse.

Die nähere Beschreibung und Deutung der vorliegenden Versuchsergebnisse werden im Kapitel "Ergebnisse und Diskussion" behandelt.

### 3.2.2 LATEX-ELEKTROPHORESE-TEST BSA-DIGITOXIN-NACHWEIS

In diesem Kapitel sollte der umgekehrte Weg wie im vorigen Kapitel beschritten werden. Eine konstante Menge mit AS beschichteter Latexteilchen sollte sowohl mit einer Verdünnungsreihe von BSA-Digitoxin-Konjugat als auch mit einer Verdünnungsreihe aus reiner BSA-Lösung inkubiert und gemessen werden.

Doch trotz vielfacher Variation der Versuchsbedingungen konnte weder durch Elektrophorese- noch durch Diffusionsmessungen eine signifikante Differenzierung beider Meßreihen erzielt werden.

Die Proteinkonzentration der Verdünnungsreihen lagen zwischen 0,4 und 12.500 ng/ml Ansatz.

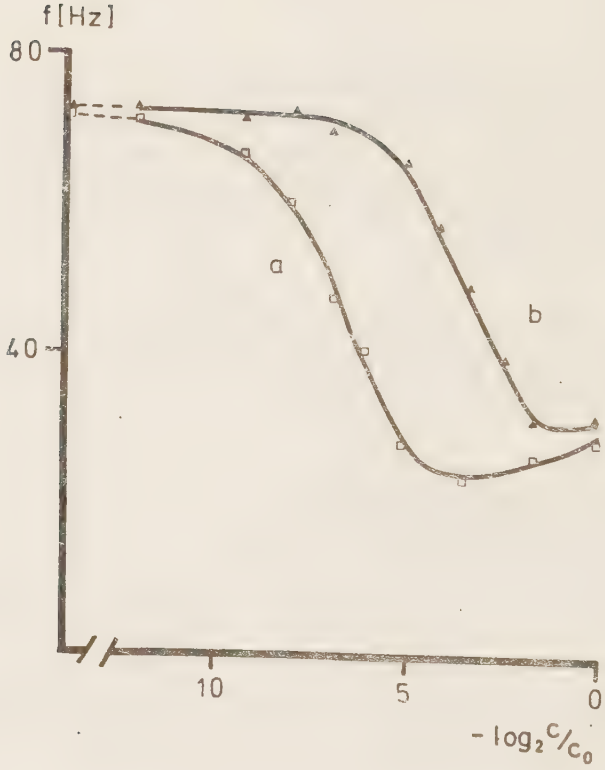



Abb. 22: Nach Verbessereung der Versuchsbedingungen (s. Text) konnten die Differenzierung von AS und unspezifischem Kontrollserum deutlich gegenüber der Abb. 21 verbessert werden.

a: AS gegen BSA-Digitoxin-Konjugat
b: unspezifisches Kontrollserum

Beide Seren enthalten einen BSA-Zusatz von 5 g/l. Die Konzentration der beschichteten Latexteilchen beträgt konstant $5 \times 10^6$ part./ml.
$c_o$: 1:200 der Originalseren

### 3.2.3 LATEX-ELEKTROPHORESE-TEST DIGITOXIN-NACHWEIS

Im folgenden Kapitel wird gezeigt, daß mit der Laser-Doppler-Spektroskopie der Nachweis von freiem Digitoxin in wäßrigen Lösungen möglich ist. Für diese Versuche wurden Latexteilchen mit einem Durchmesser von d = 0,794 um verwendet, als Puffermedium diente ein Tris-HCl-Puffer mit pH = 8,6 und I = 0,005. Als Digitoxin-Stammlösung wurde das im Handel erhältliche Präparat Digimerck$^{o}$ 1/4 mg (Chargen-Nr. A 1643241) der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Alle Verdünnungsschritte der folgenden Versuche wurden mit o.a. Tris-HCl-Puffer ausgeführt.

Ausgehend von der oben beschriebenen Digitoxin-Stammlösung mit 0,25 mg Digitoxin/ml wurden zwei Verdünnungsreihen mit einem jeweiligen Verdünnungsfaktor von 1:2 hergestellt. Eine der Verdünnungsreihen wurde mit Latexteilchen inkubiert, die mit AS gegen BSA-Digitoxin-Konjugat beschichtet waren (Kap. 2.2.4), die andere Verdünnungsreihe wurde mit Latexpartikeln inkubiert, die mit unspezifischem Kontrollserum (Kap. 2.2.6) beschichtet waren. Die Latexkonzentration im Reaktionsansatz betrug jeweils 0,7 x $10^{7}$ part./ml, die Inkubationszeit betrug drei Stunden bei $4^{0}$C. Nach der Inkubation wurden die Proben mit o.a. Puffer zweimal gewaschen und im selben Volumen wieder gelöst. Die anschließende Messung der Proben erfolgte mit einem He-Ne-Laser ($\lambda_o$ = 632,8 nm) in einem elektrischen Feld von E = +/- 50 V/cm, die Kapillare hatte eine Länge von 21,0 mm, der Meßwinkel $\theta$ betrug $15^{o}$. Es galten die Bedingungen der Gl. 46.

Abb. 23 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Messungen. Ein signifikanter Frequenzabfall ist bei beiden Versuchsreihen nicht festzustellen. Beide Kurven laufen parallel zur x-Achse. Ihr mittlerer Abstand zueinander beträgt etwa 10 Hz.

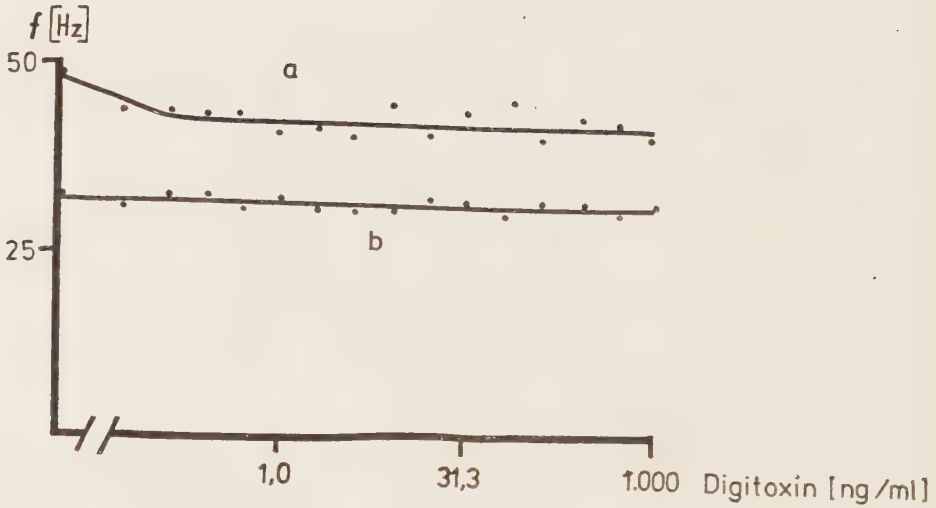



Abb. 23: Abhängigkeit der Dopplerfrequenz $f_D$ von Serum-beschichteten Latexteilchen von der Digitoxin-Konzentration.

a: AS-beschichtete Latexteilchen

b: mit unspezifischem Kontrollserum beschichtete Latexteilchen

Die cPLS-Konzentration lag konstant bei $7 \times 10^6$ part./ml.

Eine Beeinflussung der Meßergebnisse durch die Konzentration der Latexteilchen lag nicht vor. Die Ergebnisse der Tab. 14 zeigen, daß die Mobilität $\mu$ der beschichteten Latexteilchen im Bereich zwischen $2 \times 10^5$ part./ml und $2 \times 10^8$ part./ml konzentrationsunabhängig sind.

Nach einer technischen Verbesserung der Meßzellen, die es ermöglichte, Elektrophoresemessungen auch bei höheren Ionenstärken durchzuführen, wurde die o.a. Versuche mit physiologischer NaCl-Lösung wiederholt. Ansonsten entsprachen die Versuchsbedingungen den oben beschriebenen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Abb. 24 dargestellt. Die Kurve 24 a zeigt Werte mit Kontrollserum, Kurve 24 b gibt die Werte mit AS wieder.

Aus dem Kurvenverlauf läßt sich eine deutliche Ag-Ak-Reaktion ablesen. Erhöht man die Digitoxinkonzentration in den Ansätzen, verschiebt sich die Kurve der Abb. 24 b nach links, während die Kontrollkurve der Abb. 24 a unverändert bleibt.

### 3.2.4 ERYTHROZYTEN-TEST MIT DIGITOXIN

Methodische Überlegungen führten zu der Annahme, daß AS-beschichtete Erythrozyten sich möglicherweise ebenso für den Digitoxin-Immuno-Assay eignen wie AS-beschichtete Latexteilchen. Ihre Bewegungen könnten zudem unter dem Mikroskop beobachtet werden.

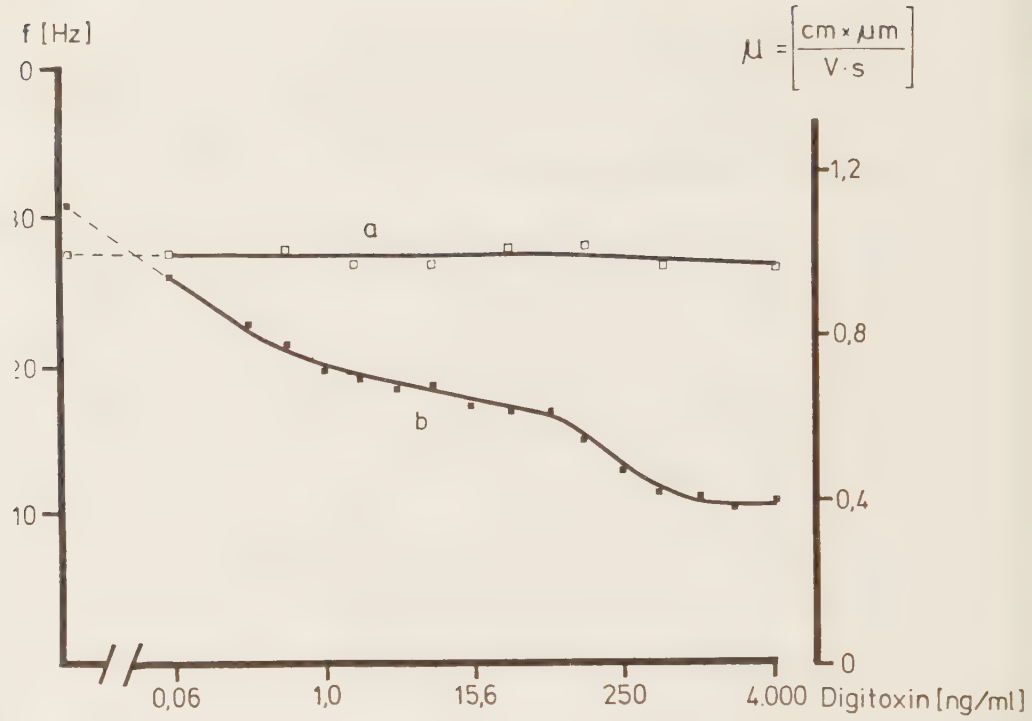



Abb. 24: Abhängigkeit der Dopplerfrequenz $f_D$ von der Digitoxin-Konzentration nach geänderten Versuchsbedingungen gegenüber den Versuchen der Abb. 23.

a: mit unspezifischem Kontrollserum beschichtete Latexteilchen

b: mit AS beschichtete Latexteilchen

Die cPLS-Konzentration lag konstant bei 7 x $1o^6$ part./ml

Tabelle 14

| $c_{PLS}$ (AS) | $f_D$ Hz | Mobilität u $\frac{um \times cm}{V \times s}$ |
|---|---|---|
| $2 \times 10^5$ part./ml | 42,0 | 1,53 |
| $2 \times 10^6$ " | 42,2 | 1,54 |
| $2 \times 10^7$ | 42,2 | 1,54 |
| $2 \times 10^8$ | 42,0 | 1,53 |

| $c_{PLS}$ (Kontrolle) | $f_D$ Hz | Mobilität u $\frac{um \times cm}{V \times s}$ |
|---|---|---|
| $2 \times 10^5$ part./ml | 31,4 | 1,14 |
| $2 \times 10^6$ " | 31,2 | 1,14 |
| $2 \times 10^7$ " | 31,4 | 1,14 |
| $2 \times 10^8$ " | 31,4 | 1,14 |

Die Wanderungsgeschwindigkeit Serum-beschichteter Latexteilchen ist im o.a. Bereich unabhängig von deren Konzentration

### 3.2.4.1 BESCHICHTUNG VON ERYTROZYTHEN MIT ANTISERUM GEGEN BSA-DIGITOXIN-KONJUGAT

Für die angestrebten Versuche mußten zunächst Erythrozyten mit AS beschichtet werden. Hierzu schienen ETS-(tannierte Schafserythrozyten) Zellen der Fa. Behring Werke AG, Marburg/Lahn, geeignet. Es handelte sich um EMT-Indikatorzellen mit der Chargen-Nr. ORZN 12/13, K.-Lot-Nr. A 406004 A.

Eine Erythrozythenverdünnung von $4 \times 10^8$ Zellen/ml wurde dreimal in einem Phosphatpuffer mit pH = 7,42 und I = 0,09 gewaschen. Dieser Ansatz wurde anschließend 24 Stunden bei $4^oC$ mit AS inkubiert. Das Verhältnis Erythrozyten (mit $4 \times 10^8$ Zellen/ml) zu unverdünntem AS betrug 5:1.

Nach dem der Inkubation wurde der Ansatz zweimal je fünf Minuten bei 2.000 g gewaschen und im selben Volumen des o.a. Puffers gelöst, so daß die Stammlösung der beschichteten Erythrozyten $4 \times 10^8$ Zellen/ml enthielt. Die so behandelten Erythrozyten liefen bei den Elektrophoresemessungen im o.a. Puffer mit etwa 26 Hz, unbehandelte Kontrollerys mit 21 Hz. Gemessen wurde bei einem Meßwinkel von $\theta = 15^o$ bei einer Wellenlänge des Ar-Lasers von $h_o = 488{,}0$ nm.

### 3.2.4.2 ERYTHROZYTEN-ELEKTROPHORESE-TEST MIT DIGITOXIN

Für diese Versuchsreihe wurde eine Digitoxin-Verdünnungsreihe hergestellt, die mit 50.000 ng Digitoxin/ml begann und bis zu einer Konzentration von 0,05 ng/ml hinabreichte. Jeder Ansatz dieser Versuchsreihe wurde mit einer konstanten Menge Erythrozyten mit $c_o = 10^6$ Erys/ml Ansatz für 24 Std. bei $4^oC$ inkubiert. Leider konnte bei diesen Versuchen keine signifikante Frequenzänderung - auch nach Modifikation der Versuchsbedingungen nicht - erzielt werden, obwohl

sowohl unter dem Mikroskop als auch bei qualitativen Diffusionsmessungen eine deutliche Aggregation nachgewiesen werden konnte. Deshalb wurden die Elektrophoresemessungen mit den beschichteten Schafserythrozyten eingestellt und Diffusionsmessungen vorgenommen.

### 3.2.4.3 ERYTHROZYTEN-DIFFUSIONS-TEST MIT DIGITOXIN

Die oben beschriebenen Reaktionsansätze wurden unter homodynen Bedingungen getestet. Obwohl eindeutig eine Agglutination nachgewiesen werden konnte, war es nicht möglich, eine Änderung der Halbwertszeit $\tau_A$ einer bestimmten Digitoxinverdünnung zuzuordnen, da die entstandenen Aggregate zu schnell durch Sedimentation auf den Boden der Meßküvette sanken. Dadurch wurden die Diffusionsbewegungen der Teilchen derart überlagert, daß eine sinnvolle Messung unmöglich wurde.

Unter den vorliegenden Bedingungen ist zwar ein qualitativer aber kein quantitativer Digitoxin-Nachweis möglich. Vielleicht kann ein semiquantitativer Nachweis analog dem HCG-Objektträger-Test mit optisch sichtbaren Erythrozytenkonzentrationen erarbeitet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine weiteren Versuche in dieser Richtung unternommen.

## 3.2.5 DIGITOXIN-DIFFUSIONS-TEST OHNE "CARRIER"-TEILCHEN DIGITOXIN-NACHWEIS

Für die im folgenden Kapitel beschriebenen Versuche wurden weder Latexteilchen noch Erythrozyten als Trägerteilchen für Antigen bzw. Antikörper verwendet. Das AS wurde direkt mit dem Antigen inkubiert und anschließend gemessen.

Sollten diese Vesuche erfolgreich sein, würde ein relativ arbeitsaufwendiger Schritt im Versuchsaufbau wegfallen. Die unten beschriebenen Versuche wurden in physiologischer NaCl-Lösung ohne jeden Zusatz durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit dem in Kap. 3.2.1 erwähnten Ar-Laser bei einer Wellenlänge von $h_o$ = 488,0 nm. Die runde Meßküvette hatte einen Innendurchmesser von 6,2 mm. Die Messungen wurden unter homodynen Bedingungen durchgeführt, der Meßwinkel betrug $\theta = 15^o$.

Zunächst wurde ein Vorversuch gestartet. Reines AS (Kap. 2.2.4 wurde im Wasserbad auf 20°C erwärmt, 1:12 verdünnt und die Halbwertszeit $\tau_A$ (Abb. 1B) bestimmt. Anschließend wurden 0,8 ml einer physiologischen NaCl-Lösung mit 40 ng/ml Digitoxin zugegeben. Die Konzentration des AS betrug jetzt 1:24 der unverdünnten Charge, die Digitoxinkonzentration 20 ng/ml. Die Halbwertszeit $\tau_A$ dieses Reaktionsansatzes wurde nun kontinuierlich gemessen. Abb. 25 gibt die Meßergebnisse nach 5 bzw. 30 Minuten wieder. Es konnte eine deutliche Verschiebung beider Kurven nachgewiesen werden.

Nachdem die Vorversuche erfolgreich abgeschlosschen waren, konnten systematische Untersuchungen beginnen.

Für die folgenden Versuche wurde eine Digitoxin-Verdünnungsreihe angesetzt, deren Konzentration sukzessive 1:2 verringert wurde bis zu einer Menge von c = 0,01 ng/ml. Zu jedem Verdünnungsschritt wurde dann eine konstante Menge AS zugegeben, so daß die AS-Konzentration im Reaktionsansatz konstant 1:15 der unverdünnten Charge und die höchste Digitoxinkonzentration $c_o$ = 160 ng/ml betrug. Die Meßbedingungen entsprachen denen des Vorversuches. In Abb. 26 sind die Meßergebnisse graphisch dargestellt. Die Inkubationszeit der in Kurve 26 A gemessenen Werte betrug 5 Minuten, diejenigen der Kurve 26 B 45 Minuten. Die Inkubationstemperatur wurde durch ein Wasserbad bei jeweils 20°C gehalten.

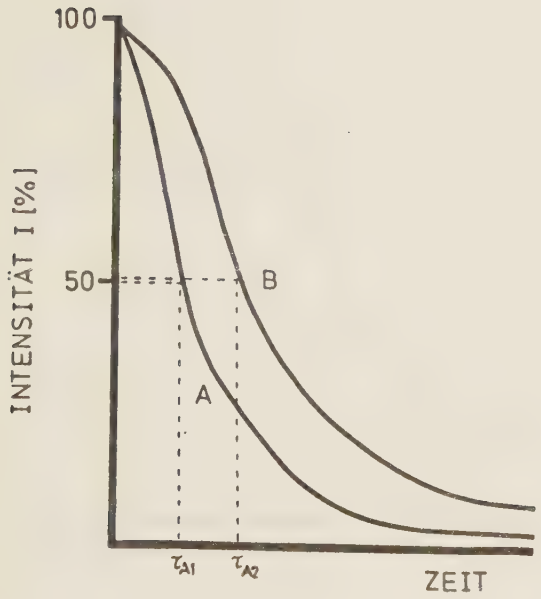



Abb. 25: 1:24 verdünntes AS gegen Digitoxin nach Zugabe von 4o ng Digitoxin/ml.
Messung nach 5 Minuten: $\tau_{A1}$ Kurve A
Messung nach 3o Minuten: $\tau_{A2}$ Kurve B
Die Abbildung zeigt eine deutliche Vergrößerung der Halbwertszeit $\tau_A$ durch zunehmende Aggregatbildung.

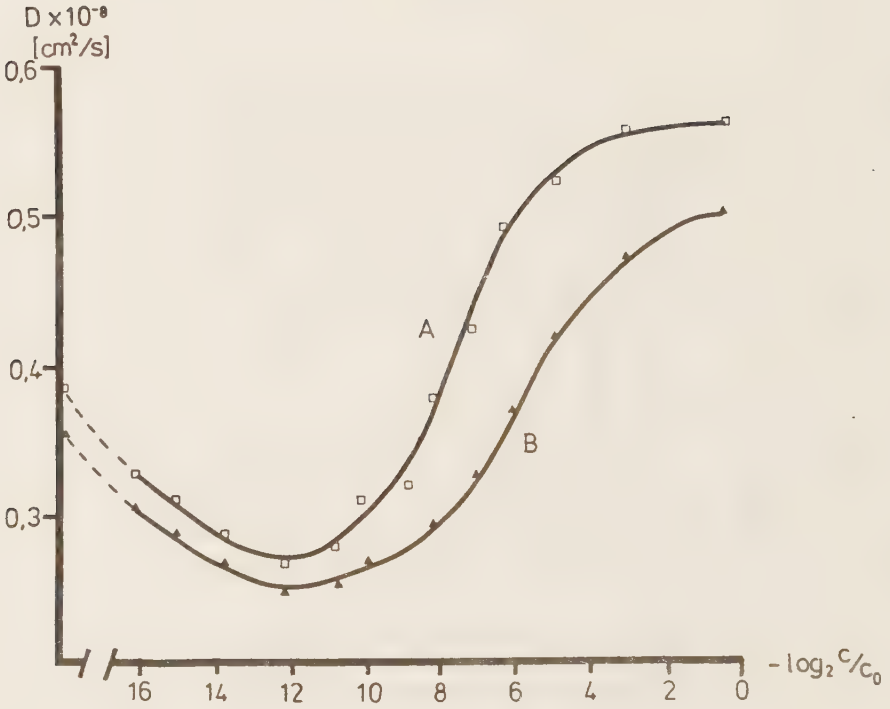



Abb. 26: Diffusionskonstante D von AS als Funktion der Digitoxin-Konzentration
Kurve A: Messung nach 5 Minuten
Kurve B: Messung nach 45 Minuten

Die Abbildung zeigt eine Verschiebung der gesamten Kurve nach unten durch zunehmende Aggregatbildung in der Zeit zwischen 5 und 45 Minuten. Bei Inkubationszeiten größer 45 Minuten findet keine Verschiebung der Kurve mehr statt. Die Reaktionszeit für den oben beschriebenen Reaktionsansatz sollte also mindestens 45 Minuten betragen.

$c_o$: 160 ng Digitoxin/ml

## 3.2.6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In den vorliegenden Versuchen wurde mit mehreren Methoden versucht, Digitoxinspiegel sowie Ak-Titer gegen Digitoxin zu bestimmen. Beim Latex-Elektrophorese-Test (Kap. 3.2.1) zum Ak-Nachweis konnte gezeigt werden, daß unter bestimmten Voraussetzungen eine Differenzierung von AS und unspezifischem Serum möglich ist. Die besten Resultate konnten mit einem Phosphatpuffer mit pH = 7,3, einer Inonenstärke I = 0,0035 und einem BSA-Zusatz von 5 g/l erzielt werden. Die zweimalige Zentrifugation nach der Inkubation von cPLS und AS verbessert die Ergebnisse des Tests beträchtlich (Abb. 21/22). Ein Zusatz von reinem BSA zur Pufferlösung als Stabilisator scheint für eine Ag-Ak-Reaktion förderlich zu sein , denn bei den Versuchen ohne BSA-Zugabe konnten beim Ak-Nachweis keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. Auch ein Zuviel an BSA scheint einen negativen Einfluß auf die Immunreaktion zu besitzen: bei einem Zusatz von 19 g BSA/l wurde ebenfalls keine Ag-Ak-Reaktion nachgewiesen. Wie aus den Versuchen der Abb. 19 hervorgeht, beeinflußt eine BSA-Zugabe nicht die Wanderungsgeschwindigkeit der beschichteten Latexteilchen, sondern erzeugt lediglich einen weiteren "peak" im Frequenzspektrum des gestreuten Laserlichts. Dieser "peak" befindet sich unabhägig von der jeweiligen Serumkonzentration immer an der gleichen Stelle bei etwa 34 Hz, während die übrigen "peaks" je nach AS-Konzentration zwischen etwa 20 Hz und 60 Hz wandern.

Aus den Versuchen der Abb. 22 geht hervor, daß der Kurvenverlauf für AS und unspez. Serum (Kontrollserum) parallel erfolgt. Der "Abstand" beider Kurven entspricht etwa einem Faktor von zehn der jeweiligen Serumkonzentrationen. Der Frequenzabfall beim unspez. Serum erfolgt also erst bei einer zehnfach höheren Serumkonzentration als der des AS.

Der Beginn des Frequenzabfalles lag für AS bei einer Verdünnung von etwa 1:500.000, der für Kontrollserum bei etwa 1:50.000. Damit konnte auch bei wiederholten Messungen eindeutig eine Differenzierung von AS und Kontrollserum erzielt werden.

Durch Variation der cPLS-Konzentation wird es möglich sein - ähnlich dem HSA- bzw. BSA-Immuno-Assay - die Testempfindlichkeit innerhalb gewisser Grenzen einzustellen (Tab. 13). Über eine Eichkurve eines AS mit bekanntem Ak-Titer kann dann - gleiche Aviditäten vorausgesetzt - der Ak-Gehalt anderer Antiseren gegen Digitoxin ermittelt werden. Mit dieser Methode können Digitoxin-Ak qualitativ sowie quantitativ bestimmt werden.
Für die klinische Anwendung muß vorher noch der Einfluß anderer Serumbestandteile wie Bilirubin, Fette, etc. ermittelt werden. Diese Versuche müssen größeren kontrollierten Studien vorbehalten bleiben.

Untersuchungen zur Haltbarkeit der angesetzten Verdünnungsreihen haben gezeigt, daß die Proben innerhalb von 24 Stunden durchgemessen werden sollten, da sonst ebenso wie beim Albumin-Immuno-Assay Einbußen der Meßempfindlichkeit und der Meßgenauigkeit in Kauf genommen werden müssen.

Bei den Bemühungen, anstelle von AS BSA-Digitoxin nachzuweisen, konnte im Elektrophorese-Test keine signifikante Trennung beider Kurven erzielt werden (Kap. 3.2.2).

Die Ergebnisse des Kap. 3.2.3 zeigen, daß der Nachweis von freiem Digitoxin in wäßrigen Lösungen dagegen durchaus möglich ist. Zufriedenstellende Resultate konnten in reiner physiol. NaCl-Lösung unter einem Meßwinkel von $\theta = 15^{o}$ erzielt werden. Die untere Nachweisgrenze für freies Digitoxin lag bei etwa 0,25 ng/ml Ansatz, die obere Nachweis-

grenze bei etwa 1.000 ng/ml. Der Meßbereich erfaßt damit nicht nur den therapeutisch interessanten Bereich, sondern läßt auch die Messung weit höherer Konzentrationen zu.

Die Genauigkeit des Tests lag bei etwa +/- 1/2 Verdünnungsschritt. Auch bei diesem Test wird sich die Empfindlichkeit durch Optimierung des Puffermilieus etc. innerhalb gewisser Grenzen variieren und verbessern lassen. Systematische Versuche zu dieser Fragestellung wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Die Mobilität u Serum-beschichteter Teilchen ist im meßtechnisch interessanten Bereich zwischen $2 \times 10^5$ und $2 \times 10^8$ part./ml konzentrationsunabhängig (Tab. 14), so daß durch deren Variation keine Verschlechterung der Meßgenauigkeit zu erwarten wäre, wohl aber eine Veränderung der Empfindlichkeit möglich wird.

Ein Diffusionstest zum Digitoxin-Nachweis mit Latexteilchen wurde nicht durchgeführt, vielmehr konnte bei Diffusionsmessungen ohne Verwendung von "carrier"-Teilchen eine Ag-Ak-Reaktion nachgewiesen werden. Alle Verdünnungen wurden mit physiol. NaCl-Lösung vorgenommen. Auch bei diesen Versuchen können also die Versuchsergebnisse durch Optimierung des Puffermilieus, etc. sicher noch verbessert werden. Die minimale Inkubationszeit für konstante Meßergebnisse lag für eine Inkubationstemperatur von $20^{\circ}C$ bei etwa 45 Minuten. Bei einer Inkubationszeit von mehr als 45 Minuten entsprechen alle Meßwerte denen der Abb. 26 B. Die Reaktion hatte dann ihr Gleichgewicht erreicht.

Die Leerwerte für reines AS weisen eine Diffusionskonstante von $D = 0{,}36 \times 10^{-8}$ $cm^2/s$ auf, während für Proben mit einem Digitoxin-Anteil von größer 160 ng/ml Diffusionskonstanten von $D = 0{,}5 \times 10^{-8}$ $cm^2/s$ findet man ein

Minimum im Funktionsgraphen (größte Diffusionskonstante) bei einer Digitoxin-Konzentration von 0,04 ng/ml. Bei diesem Wert scheint es sich um ein Reaktionsmaximum zu handeln, bei dem das Verhältnis von AS und Ag eine optimale Reaktion erlauben.

Weshalb die Diffusionskonstanten für Digitoxin-Konzentrationen größer 2,5 ng/ml den Leerwert des AS unterschreiten ist ungeklärt.

Bei den Diffusionsmessungen lagen die Meßgrenzen ebenso wie bei der Elektrophorese im therapeutisch interessanten Bereich. Die Versuche mit beschichteten Erythrozyten zum Digitoxin-Nachweis brachten keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Mit der Laser-Doppler-Spektroskopie konnten weder bei der Diffusion noch bei der Elektrophorese konzentrationsabhängige Eichkurven erstellt werden, obwohl eindeutig eine Agglutination bei den Reaktionsansätzen stattgefunden hatte. Mikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß die Sedimentation der Aggregate zu schnell erfolgt. Die vertikale Sedimentationsbewegung überlagert vollständig die Änderung der Brown'schen Molekularbewegungen.

Mit dieser Methode läßt sich zwar kein quantitativer, vielleicht aber ein qualitativer Digitoxin-Nachweis führen. Wie in Kap. 3.2.4.3 bereits erwähnt, könnte mit den beschichteten Erys ein semiquantitativer Objektträger-Test analog dem HCG-Objektträger-Test erarbeitet werden. Für die Laser-Doppler-Spektroskopie scheint ein Digitoxin-Nachweis mit beschichteten Erythrozyten ungeeignet.

Die Versuche zum Digitoxin-Immuno-Assay haben gezeigt, daß mit der LDS sowohl ein Ak- als auch ein Digitoxin-Nachweis möglich ist. Die Messungen können mit beschichteten Latexteilchen sowie ohne "carrier"-Teilchen durchgeführt werden.

Welche der beiden Methoden sich letzten Endes als die beste herausstellen wird, müssen nachfolgende umfangreichere Meßreihen unter weiter optimierten Bedingungen zeigen. Als aussichtsreichste Methode scheint sich nach den vorliegenden Untersuchungen der Latex-Elektrophorese-Test herauszukristallisieren, sowohl für den AS-Nachweis als auch für den Digitoxin-Nachweis.

## 3.3 MYOSIN-IMMUNO-ASSAY

### 3.3.1 MYOSINGEWINNUNG

Die bisher untersuchten Testsysteme benutzten zur Erhöhung des Laserstreulichts Trägerteilchen, z.B. Latexteilchen oder Erythrozyten. Am Beispiel eines Myosin-Immuno-Assays soll nun die Empfindlichkeit der Laser-Doppler-Spektroskopie ohne zusätzliche Trägerteilchen ausgetestet werden. Zu diesem Zweck konnte mit freundlicher Hilfe von Herrn Dipl.-Chem. W. Schäfer (Institut für Klin. Chemie der Universität Düsseldorf, Dir. Prof. Dr. Staib) eine hochgereinigte Charge von Myosin sowie AS gegen dieses Myosin hergestellt werden. Die einzelnen Schritte der Myosingewinnung sind der Tab. 15 zu entnehmen.

Die Kontrolle der einzelnen Präparationsschritte wurde mit Hilfe der SDS-Elektrophorese durchgeführt. Für den Myosin-Immuno-Assay fanden nur die Spitzenfraktionen mit dem höchsten Gehalt an Myosin Verwendung (Abb. 27 A und B). Eine detaillierte Beschreibung der Präparationstechnik und der Qualitätskontrolle findet sich in der Dissertationsschrift von Schäfer (59).

### 3.3.2 GEWINNUNG VON ANTISERUM GEGEN MYOSIN

Mit dem oben beschriebenen hochgereinigten Myosin wurden sechs Angora-Kaninchen (3 weibl; 3 männl.) zur Gewinnung von AS immunisiert. Dazu wurden den Tieren am Rücken subkutane Myosindepots zusammen mit Freund'schem Adjuvans gespritzt. Dieser Vorgang wurde innerhalb von sechs Monaten mehrfach wiederholt, bis die Tiere einen zufriedenstellenden Ak-Titer im Blut aufwiesen. Das Serum von den zwei Tieren, die den höchsten Ak-Titer besaßen, wurde für die folgenden Versuche

Tabelle 15

2. Präparationsschema zur Gewinnung von Myosin

Kleingehackter Muskel

Zerkleinerung mit 4 Vol. Vorextraktionspuffer
50 mM Imidazol-Puffer / pH 6.80
0.1 mM EGTA / 10 mM $NaPP_i$
0.1 mM DTT / 50 mM KCl

3 x waschen

Sed — Üb

10 min/10000 x g

a) Homogenisierung mit 3 Vo. 0.37 M KCl
50 mM Imidazol / 10 mM $NaPP_i$ / 0,1 mM DTT
pH 6.80
b) 15 min rühren

Üb — 10 min/10000 x g — Sed

a) Filtration unter leichtem Unterdruck durch Glaswolle
b) Fällung mit 10 Vol. Wasser, über Nacht stehen lassen zum Absetzen des Präzipitates
c) dekantieren

Sed — 10 min/10000 x g — Üb

a) Lösen mit 3 Vol. 0.5 M KCl / 50 mM Tris / HCl
pH 7.60 / 1 mM EDTA / 6 mM $MgCl_2$ / 0.1 mM DTT
b) die Lösung wird mit konzentrierter und neutraler ATP-Lösung 4 mM an ATP gemacht

Üb — 90 min/10000 x g — Sed

oberen 2/3 werden zur Ammoniumsulfatfällung verwendet

Ammoniumsulfatlösung: bei $0^{\circ}C$ gesättigte Ammoniumsulfatlösung; 1 mM an EDTA / mit 2.5 M Ammoniak neutralisiert

Ammoniumsulfatfällung zwischen 0-38 % Sättigung

Üb — 10 min/10000 x g — Sed

Ammoniumsulfatfällung zwischen 38-50 % Sättigung

Sed — 10 min/10000 x g — Üb

Lösen des Sedimentes mit 1 Vol. 2-fach konzentriertem Startpuffer der Säulenchromatographie

ausgiebige Dialyse gegen den Startpuffer

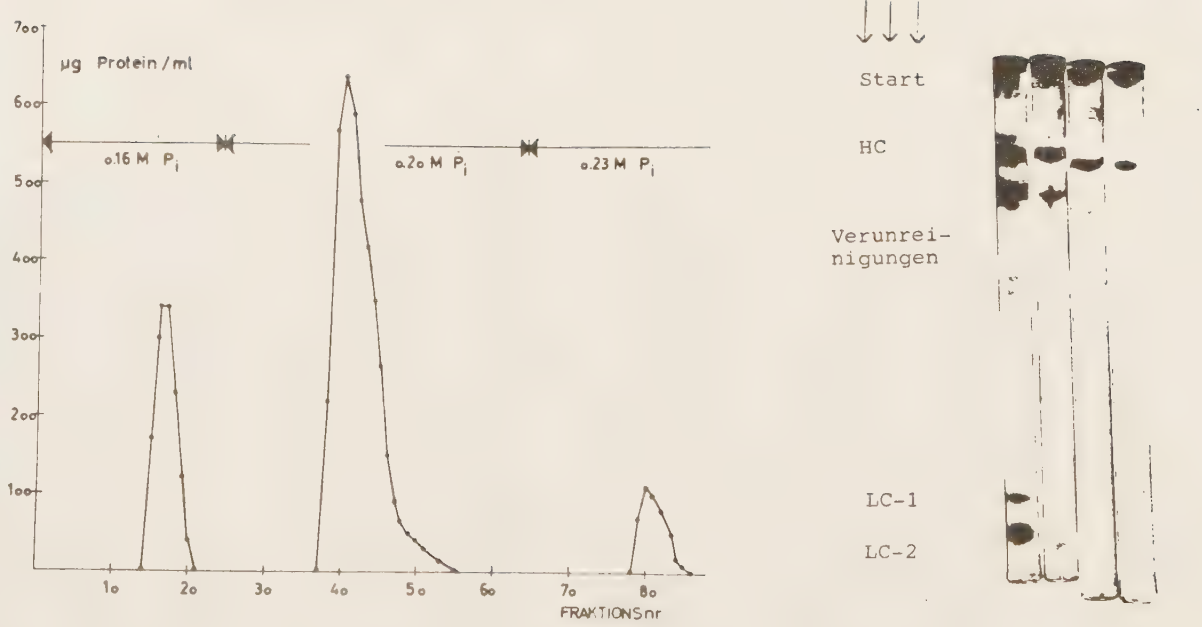



Abb. 27: Myosin-Praparation

A: Säulenchromatographie von Myosin (s.a. Tab. 15) Nur die Spitzenfraktionen Nr. 38 bis 42 wurden für die beschriebenen Versuche verwendet.

B: Qualitätskontrolle der Myosin-Präparation durch SDS-Gelelektrophorese mit einer Startmenge von 50 ug Myosin. Die Kontrolle ergab eine hochgereinigte Myosincharge.

HC: heavy chains ; LC: light chains

verwendet. Dazu wurde die Gamma-Globulinfraktion des Mischserums konzentriert. Als Kontrollserum diente die ebenfalls eingeengte Gamma-Globulinfraktion eines weiteren nur mit Freund'schem Adjuvans und physiol. NaCl-Lösung "immunisierten" Kaninchens.

### 3.3.3 MYOSIN-DIFFUSIONS-TEST MYOSIN-NACHWEIS

Vor dem Einsatz in den Immuno-Assay wurde das Myosin über eine Sephadex-Säule mit einem 40 mM Pyrophosphat-Puffer äquilibriert. Der pH-Wert wurde auf 8,5 eingestellt, die Ionenstärke betrug I = 0,4. Zur Konservierung wurde Natriumazid ($NaN_3$) in einer Konzentration von 3 mM/l zugesetzt. Die mit o.a. Puffer angesetzte hochgereinigte Myosin-Stammlösung besaß eine Myosin-Konzentration von $c_{Myosin}$ = 2,74 mg/ml. Das gewonnene AS wurde als Nativserum verwendet. Die Proteinbestimmungen erfolgten nach der Biuret-Methode mit einem Beckmann-Photometer bei einer Wellenlänge von $h_o$ = 330 nm. Nach der Herstellung einer Myosin-Verdünnungsreihe mit o.a. Pyrophosphat-Puffer wurden 500 ul jeder Verdünnungsstufe mit 500 ul nativem AS bzw. 500 ul nativem Kontrollserum inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 16 h bei 4°C. Nach der Inkubation wurden die Proben

im Wasserbad langsam auf 20°C erwärmt. Die anschließende Messung erfolgte mit einem Ar-Laser ($h_o$ = 488 nm) unter einem Meßwinkel von $\Theta = 30^{\circ}$. Alle Messungen wurden mit einer flachen Meßzelle aus Spezialglas (Proben-Durchmesser = 40 um) unter heterodynen Bedingungen durchgeführt. Die Meßzelle wurde nicht um den halben Meßwinkel $\Theta$ nachgeführt, so daß die Bedingungen der Gl. 44 Gültigkeit besaßen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind der Abb. 28 zu entnehmen.

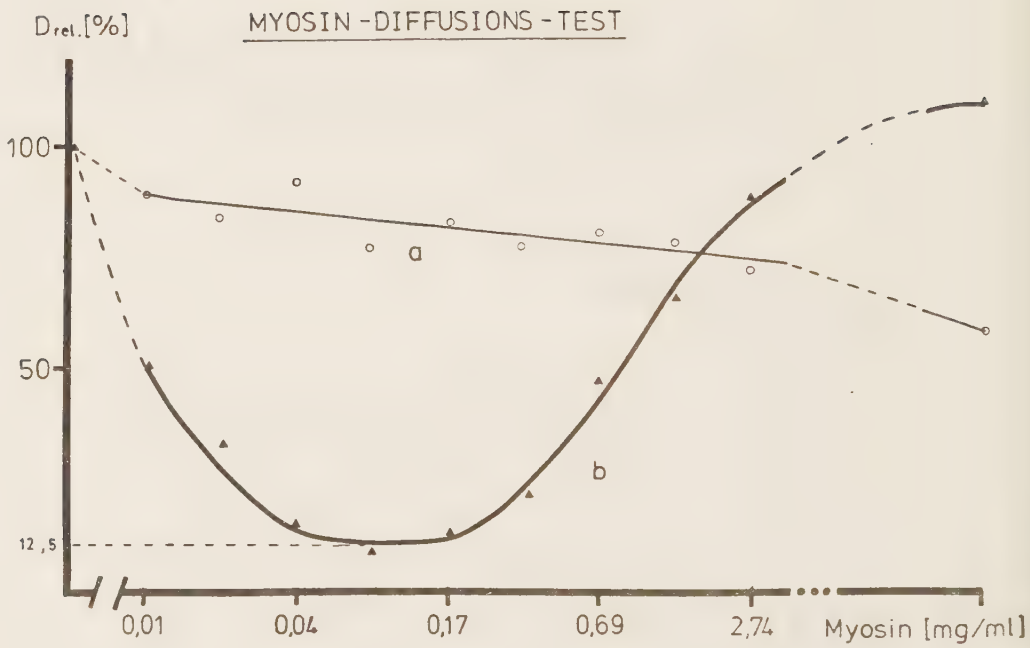



Abb. 28: Abhängigkeit der Diffusionskonstanten D von der Myosinkonzentration
a: für Kontrollserum Konstant 1:2
b: für AS gegen Myosin Konstant 1:2
Die Werte beider Kurven sind relative Werte. Die Leerwerte für Myosin sind für beide Versuchsreihen selbstverständlich gleich, so daß die Kurve a absolut gesehen zu tief gezeichnet ist.

Nach Abschluß der vorgenannten Versuche wurden AS und Myosinfraktionen luftdicht verschlossen und eingefroren. Nach Ablauf von 27 Monaten wurden erneut Versuche mit den vorgenannten Chargen durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurde ein abgewandeltes Computerprogramm und eine andere Meßzelle - eine Rundkuvette aus optischem Spezialglas mit einem Innendurchmesser von 0,8 cm - verwendet. Die Versuche fanden unter homodynen Bedingungen bei einer Wellenlänge des Lasers von $h_o$ = 476,5 nm statt.

Das Myosin wurde - ebenso wie in den vorigen Versuchen - vor dem Einsatz in den Immuno-Assay über eine Sephadex-Säule mit einem 40 mM Pyrophosphat-Puffer äquilibriert. Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt, die Ionenstärke betrug I = 0,43. Die Proteinkonzentration von Myosin wurde mit der Bio-Rad-Methode - Mikroverfahren (3) - überprüft. Die Messungen erfolgten mit einem Shimadzu-Photometer in Quarzkuvetten bei einer Wellenlänge von $h_o$ = 578 nm. Für Myosin ergab sich eine Lösung von $c_{Prot.}$ = 50,4 ug/ml (0,054 g/l).

Für die folgenden Versuche wurde das AS 1:4.000 mit Pyrophosphat-Puffer verdünnt. Aus der Myosin-Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (Verdünnungsfaktor 1:2) und zu jedem Verdünnungsschritt dieser Reihe jeweils gleiche Mengen verdünntes AS zugegeben, so daß die AS-Konzentration konstant 1:8.000 des Originalserums betrug.

Die höchste Myosinkonzentration lag bei 25,2 ug/ml Ansatz. Das Ansatzvolumen betrug jeweils 1 ml. Die Inkubationszeit lag bei 24 h, die Inkubationstemperatur betrug 4°C. Nach langsamer Erwärmung der Proben im Wasserbad auf 20°C wurden die Messungen bei einem Meßwinkel von $\Theta = 30^{\circ}$ durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche zeigt Abb. 29.

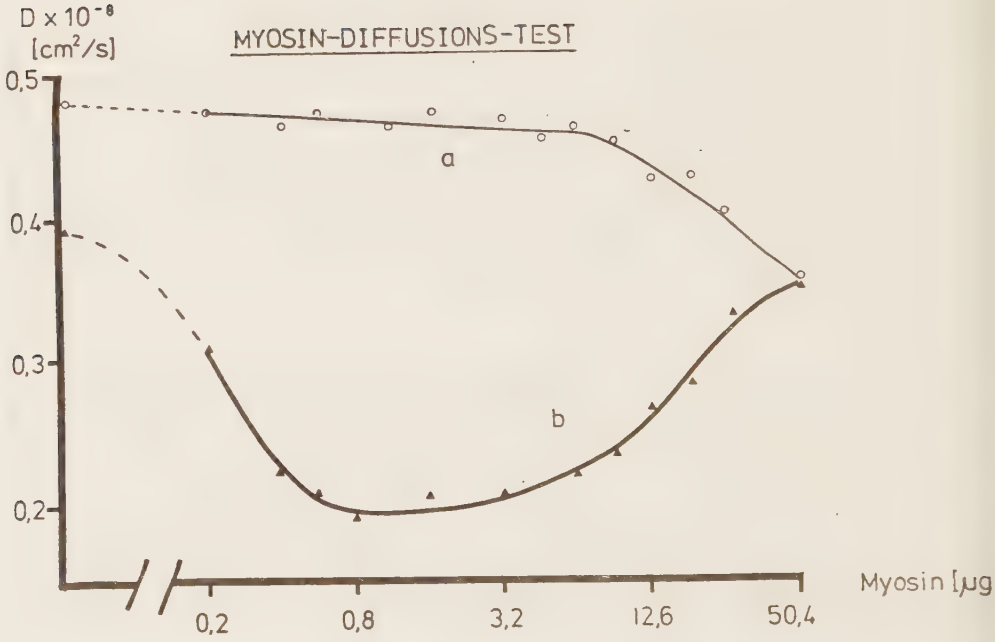



Abb. 29: Abhängigkeit der Diffusionskonstanten D von der Myosinkonzentration.

a: für Kontrollserum Konstant 1:8.000
b: für AS gegen Myosin Konstant 1:8.000

### 3.3.4 MYOSIN-DIFFUSIONS-TEST ANTISERUM-NACHWEIS

In den folgenden Versuchen sollte eine Abhängigkeit der Diffusionskonstanten D durch die Ag-Ak-Reaktion von der Myosinkonzentration nachgewiesen werden.

Zunächst wurde je eine Verdünnungsreihe des AS bzw. des Kontrollserums hergestellt. Ausgehend von einer Verdünnung von 1:20 der Originalseren betrugen die Verdünnungsschritte sukzessive 1:2.

Zu jeder Verdünnungstufe wurde eine konstante Menge Myosin gegeben. Sie lag bei $c_{Myosin}$ = 2,27 ug/ml Ansatz (1:20 der Stammlösung). Die Ansätze wurden bei 4°C 24 h lang inkubiert, das Ansatzvolumen betrug 1 ml je Probe. Die Meßbedingungen entsprachen den in Abb. 29 beschriebenen Versuchen. Die Ergebnisse der vorliegenden Versuche zeigt die Abb. 30.

### 3.3.5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Alle Versuche zum Myosin-Immuno-Assay wurden ohne "carrier"-Teilchen wie Latex oder Erythrozyten durchgeführt. Als Puffermedium diente in allen Fällen ein 40 mM Pyrophosphat-Puffer mit pH-Werten zwischen 8,0 und 8,5 und Ionenstärken I zwischen 0,4 und 0,43. Unter diesen Bedingungen liegt das Myosin in relativ stabiler Form vor (41; 59).

Abb. 28 A zeigt die Abhängigkeit der Diffusionskontante D von der Konzentration von 1:2 des Nativserums sowie bei konstanter Konzentration des Kontrollserums von 1:2 (Abb. 28 B).

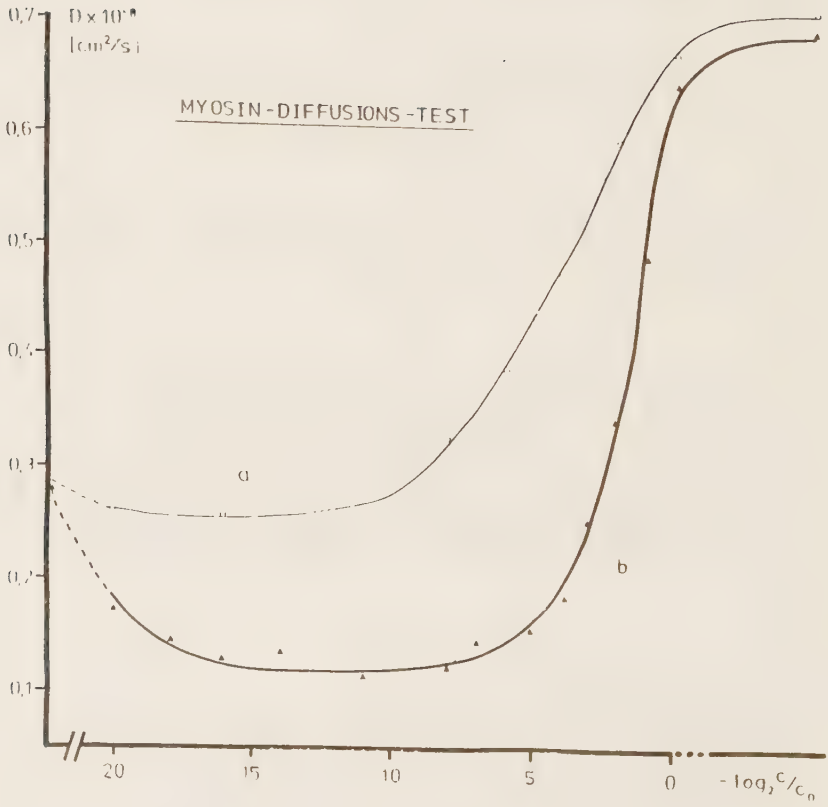



Abb. 3o: Abhängigkeit der Diffusionskonstanten D von

a: der Kontrollserum-Konzentration

b: von der AS-Konzentration

bei konstanter Myosinkonzentration von 2,27 ug Myosin/ml.

$c_o$: jeweils 1:2o für beide Seren

Setzt man die Diffusionskonstante D für AS gleich 100 % , so ergibt sich für den Leerwert des Myosins eine Diffusionskonstante von etwas über 100 %. Der Kurvenverlauf zeigt im Falle des AS eine deutliche Abhängigkeit der Diffusionskonstante D von der Myosin-Konzentration. Das Reaktionsoptimum liegt bei Myosinwerten um 100 ug/ml. Dieser Wert entspricht 12,5 % der Diffusionskonstanten des AS-Leerwertes oder einem Abfall der Diffusionskonstanten D durch die Ag-Ak-Komplexbildung um den Faktor 8. Die gleichen Versuche mit den Kontrollserum lassen keinen spezifischen Abfall der Diffusionskonstanten erkennen. D sinkt vom AS zum Myosin leicht ab (Abb. 28 B).

Nach Ablauf von 27 Monaten wurden erneut Versuche zum Myosin-Nachweis unter veränderten Versuchsbedingungen durchgeführt. Wie oben beschrieben, wurden die gleichen Chargen wie bei den vorangegangenen Versuchen verwendet. Die neuerliche Proteinbestimmung der Myosinlösung ergab einen Myosingehalt der Stammlösung von $c_{Myosin}$ = 50,4 ug/ml. Das entspricht einem Proteinverlust gegenüber dem Ausgangswert der ersten Versuche mit $c_{Myosin}$ = 2.740 ug/ml vom Faktor 55.

Berücksichtigt man den Verdünnungseffekt, der sich bei der Äquilibrierung durch die Sephadex-Säule ergibt (Faktor 8), so bleibt ein effektiver Proteinverlust, der einem Faktor zwischen 6 und 7 entspricht. Dieser Verlust ist durch Myosin-eigene Proteasen, die in jeder Myosinpräparation enthalten sind, zu erklären.

Mit dieser Charge wurden die Versuche der Abb. 29 durchgeführt. Auch bei diesen Versuchen fand sich ein Reaktionsoptimum, das bei etwa 0,05 ug/ml Myosin lag. Vergleicht man den Quotienten von Myosin- und AS-Konzentration beider Reaktionsmaxima, ergeben sich folgende Werte:

1) $\frac{\text{100 (ug/ml) Myosin}}{\text{AS}_{\text{(nativ)}} \quad \text{1:2 verdünnt}} = 2oo$

2) $\frac{\text{0,05 (ug/ml) Myosin}}{\text{AS}_{\text{(nativ)}} \quad \text{1:8.000 verdünnt}} = 4oo$

Berücksichtigt man die veränderten Versuchsbedingungen:

1) homodyne anstatt heterodyne Meßbedingungen
2) andere Meßzellen
3) andere Wellenlänge des verwendeten Laserlichts
4) anderes Computerprogramm mit geänderter Auswertung
5) veränderter pH-Wert des Puffers
6) Alter der Proben
7) anderes Protein-Bestimmungsverfahren

so zeigen beide Versuchsreihen eine erstaunliche Übereinstimmung im Reaktionsverhältnis Myosin : AS. Dieser Quotient scheint relativ konstant zu sein, gilt aber selbstverständlich nur für diese eine spezielle Präparation beider Reaktionspartner. Es muß für jede Präparation neu bestimmt werden. Bei bekannter Myosin-Charge läßt sich daraus ein Test für die relative Aktivität eines AS gegen Myosin erstellen.

Bei der ersten Versuchsreihe liegt die Diffusionskonstante D für Myosin etwas höher als diejenige für AS, in der zweiten Versuchsreihe ist es genau umgekehrt.

Dieser Sachverhalt läßt sich leicht durch eine geänderte Konformation oder durch Spontanaggregation eines Teiles der Myosinmoleküle bei geändertem pH-Wert der Pufferlösung erklären. Diese Effekte sind wiederholt in der Literatur beschrieben. Zu jeder neuen Versuchsreihe muß daher immer ein Leerwert mit Myosin mitbestimmt werden.

Die beschriebenen Versuche sind, sofern ein geeignetes AS zur Verfügung steht, ein schneller Test zum Nachweis von Myosin. Auch scheint der Test - zumindest theoretisch - über einen großen Konzentrationsbereich einstellbar zu sein. Da das Verhältnis Myosin : AS beim Reaktionsoptimum weitgehend konstant zu sein scheint, hängt die Empfindlichkeit des Tests nur von der jeweils konstanten AS-Konzentration ab. Sollte sich diese Vermutung experimentell bestätigen, wäre mit der LDS ein Myosin-Nachweis über einen großen Konzentrationsbereich möglich. Diese Untersuchungen müssen weiteren Arbeiten vorbehalten bleiben.

In Kap. 3.3.4 wird ein AS-Nachweis bei konstanter Myosin-Konzentration dargestellt. Bei diesen Versuchen liegt der Leerwert für AS etwa doppelt so hoch wie der des Myosins (Abb. 30). Nach Zugabe von Myosin fällt die Diffusionskonstante D dann aber um den Faktor 2,5 unter den Leerwert für Myosin ab, so daß es sich bei dieser Reaktion nicht allein um einen Verdünnungseffekt handeln kann. Die Kurve mit dem Kontrollserum zeigt ebenfalls einen Abfall der Diffusionskonstanten D nach Zugabe von Myosin. Diese fällt jedoch nur minimal unter den Leerwert des Myosins ab. Der gesamte Kurvenverlauf des Kontrollserums ist außerdem flacher als der bei AS. Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, daß der Abfall der Diffusionskonstanten D - ausgehend vom Leerwert des AS bis zur Höhe des Leerwertes von Myosin - auf einem unspezifischen Verdünnungseffekt von AS bzw. von Kontrollserum zurückzuführen ist, während das weitere Absinken der Diffusionskonstanten um den Faktor 2,5 beim AS auf eine spezifische Ag-Ak-Reaktion bezogen werden kann.

Mit dieser Methode ist es also grundsätzlich möglich, Antikörper gegen Myosin im Serum nachzuweisen. Inwieweit dieser Test klinische Bedeutung in der Diagnostik von bestimmten

Muskelerkrankungen mit Ak-Bildung erlangen könnte, müssen weitere eingehende Untersuchungen zeigen. Dabei bietet sich die LDS als schnell durchzuführende Testmethode an.

Sicher wäre es auch interessant, die oben beschriebenen Versuchsreihen als Elektrophorese-Test oder mit Trägerteilchen wie Latexpartikeln o.ä. durchzuführen. Entsprechende Versuche wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

## 3.4. HCG-IMMUNO-ASSAY

Die Bedeutung des Choriongonadotropins ist noch nicht sicher bekannt. Man konnte nachweisen, daß HCG das Corpus luteum am Zusammenbruch hindert. Dieses Verhalten erklärt aber noch nicht die starke HCG-Produktion im zweiten und dritten Graviditätsmonat, wenn das Corpus luteum keine schwangerschaftserhaltende Funktion mehr ausübt. Gebildet wird das HCG in der Langhans'schen Zellschicht der Plazentazotten. Es ist im Blutserum und im Urin nachweisbar. Es handelt sich um ein Proteohormon, das aus alpha- und beta-Ketten zusammengesetzt ist, wobei LH, FSH und HCG gleiche alpha-Ketten aufweisen sich aber in der Zusammensetzung der beta-Ketten unterscheiden.

Etwa 10-20 % des in der Plazenta gebildeten HCG's werden in der Leber abgebaut, etwa 3-5 % über die Nieren ausgeschieden. Über Stoffwechsel und metabolischen Abbau des HCG's ist noch nichts bekannt.

Der Beweis oder der Ausschluß einer jungen Gravidität gehört zu den häufigsten Überlegungen der gynäkologischen Praxis. Die Angaben über die letzte Regelblutung oder andere klinische Zeichen geben nur unsichere Hinweise. Die Bestimmung des HCG-Spiegels im 24 h-Urin mit einem raschen Anstieg der HCG-Ausscheidung ab der dritten Schwangerschaftswoche mit Maximum in der 10.-13. SSW hat sich als objektives Schwangerschaftszeichen herausgestellt. Bisher gibt es zahlreiche biologische und immunologische Schwangerschaftstests, die alle auf einem Nachweis von Choriongonadotropin beruhen. Ziel der nachfolgenden Versuche ist es, zu zeigen, daß mit der Laser-Doppler-Spektroskopie ein HCG- und damit ein Schwangerschaftsnachweis möglich ist.

3.4.1 LATEX-ELEKTROPHORESE-TEST
HCG-NACHWEIS IN VERSCHIEDENEN PUFFERMEDIEN

Als Materialien für die folgenden Versuche dienten Antiserum-beschichtete Latexteilchen aus einem im Handel erhältlichen Schwangerschaftstest ("Gonavislide-Test" der Firma Molter GmbH, Heidelberg), und das ebenfalls in Apotheken erhältliche HCG-Präparat Primogonyl 5000 °, der Firma Schering AG, Berlin, Chargen-Nr. 94093).

Zunächst wurde ein Vorversuch durchgeführt:
50 ul der AS-beschichteten Latexteilchen wurden mit 15 ml physiologischer NaCl-Lösung verdünnt. Jeweils 900 ul dieser 1:300 verdünnten Latexlösung wurden mit 100 ul einer HCG-Stammlösung mit 500.000 IE/l bzw. mit 100 ul physiologischer NaCl-Lösung als Kontrolle inkubiert. Beide Ansätze wurden mit der Elektrophorese-Meßzelle (Abb. 4) bei $h_o$ = 632,8 nm gemessen. Der Meßwinkel betrug 15°, die Länge der Kapillare 20 mm und die angelegte Spannung E = 50 V/cm. Abb. 31 zeigt die Frequenzverschiebung der Latex- teilchen mit bzw. ohne HCG-Zusatz. Im Anschluß an diesen Versuch wurden systematische Messungen mit HCG-Verdünnungs- reihen in verschiedenen Puffermedien durchgeführt:
Die HCG-Stammlösung (500.000 IE/l) wurde auf eine Ionenstärke von I = 0,005 gebracht (Verdünnung 1:25 mit Aq. dest.). Diese 1:25 verdünnte HCG-Stammlösung wurde weiter sukzessive 1:2 mit einem Elektrophorese-Puffer (pH = 7,35; I = 0,005) verdünnt. 500 ul der jeweiligen Verdünnungsstufe wurden mit jeweils 500 ul der 1:300 in o.a. Puffer verdünnten Latexsuspension inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 12 h bei Zimmertemperatur. Die anschließende Messung erfolgte unter den o.a. Bedingungen.
Die Versuchsergebnisse sind der Abb. 32 zu entnehmen.

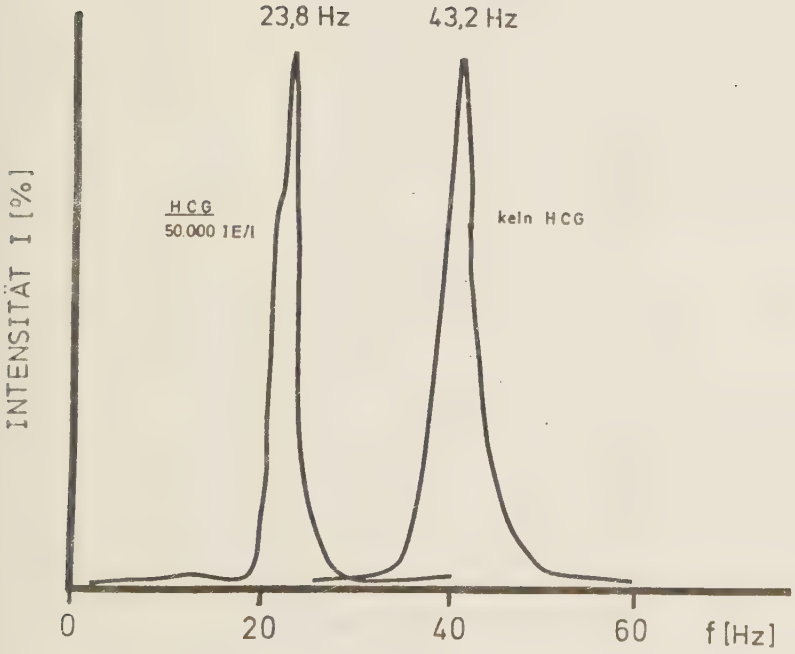



Abb. 31: Änderung der Dopplerfrequenz $f_D$ AS-beschichteter Latexteilchen durch Zugabe von Antigen:
HCG: 5o.ooo IE/ml. Versuche in physiol. NaCl-Lösung.
$h_o$: 632,8 nm ; $\Theta = 15^o$ ; E = 5o V/cm

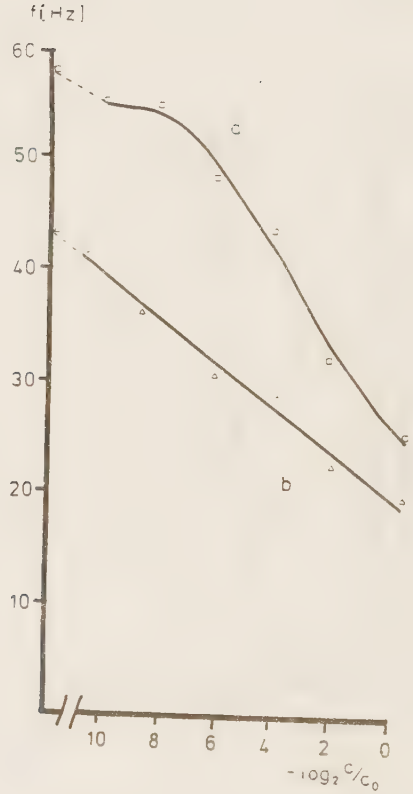



Abb. 32: Abhängigkeit der Dopplerfrequenz $f_D$ von der HCG-Konzentration bei konstantgehaltener cPLS-Konzentration.

a: Versuche in physiologischer NaCl-Lösung (I = 0,154)

o: Versuche in Elektrophorese-Puffer (I = 0,005)

$\lambda_o$ = 632,8 nm ; $\Theta$ = 15° ; E = 50 V/cm

$c_o$ = 80.000 IE HCG/l

Die gleichen Versuche wurden mit physiologischer NaCl-Lösung anstelle des Elektrophorese-Puffers durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind ebenfalls in Abb. 32 dargestellt.Weitere Versuche unter denselben Versuchsbedingungen wurden noch mit Hank's balanced salt solution (without phenol red), Flow Laboraties, Lot-Nr. 1837128 bei I = 0,005 (Abb. 33, Kurve a) und bei I = 0,154 (Abb. 33, Kurve b) und mit einem 20 mM Hepes-NaCl-Puffer (pH = 7,08) (Abb. 34) durchgeführt. In Abb. 34 wurde zudem noch die prozentuale Hemmung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der Latexteilchen in Abhängigkeit von der HCG-Konzentration dargestellt.

### 3.4.2 LATEX-ELEKTROPHORESE-TEST HCG-NACHWEIS IN URIN

Trotz zahlreicher Versuchsreihen mit unterschiedlich eingestellten Urinen (pH-Wert, Ionenstärke, mit und ohne Filtrieren bzw. Zentrifugieren, etc.), war es nicht möglich, einen HCG-Nachweis in Urin mit Hilfe des Elektrophorese-Testes zu erbringen. In den Verdünnungsreihen wurden für alle Ansätze - ob mit oder ohne HCG-Zusatz - immer die gleichen Wanderungsgeschwindigkeiten gemessen, obwohl sich eindeutig eine qualitative Änderung des Streusignals und der Intensität des Streulichtes nachweisen ließen und der als Kontrolle durchgeführte Objektträgertest positive Resultate für die HCG-enthaltenden und negative für die HCG-freien Urine ergab.

### 3.4.3 LATEX-DIFFUSIONS-TEST HCG-NACHWEIS IN URIN

Obwohl durch die Elektrophoresemessungen bei den Urinproben kein HCG-Nachweis möglich war, konnte bei Diffusionsmessungen

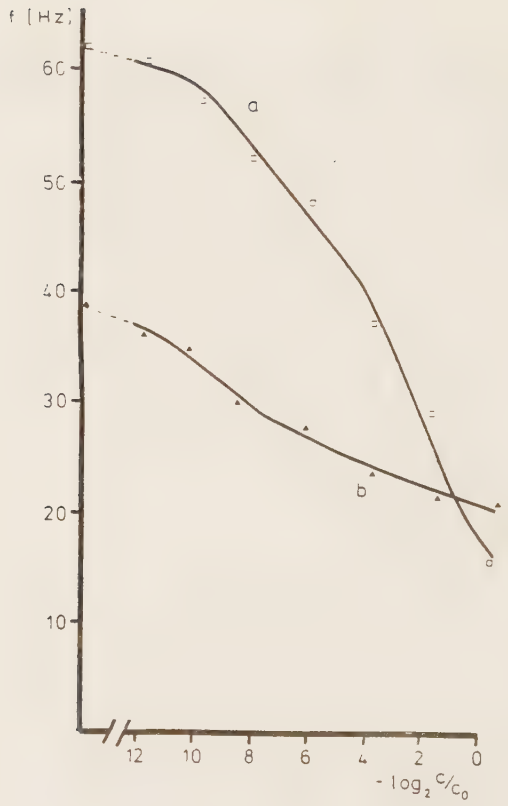



Abb. 33: Abhängigkeit der Dopplerfrequenz $f_D$ von der HCG-Konzentration bei konstantgehaltener cPLS-Konzentration.
Versuche in Hank's balanced salt solution

a: bei I = o,oo5
b: bei I = o,154

$h_o$ = 632,8 nm ; $\Theta$ = $15^o$ ; E = 5o V/cm
$c_o$: 25o.ooo IE HCG/l

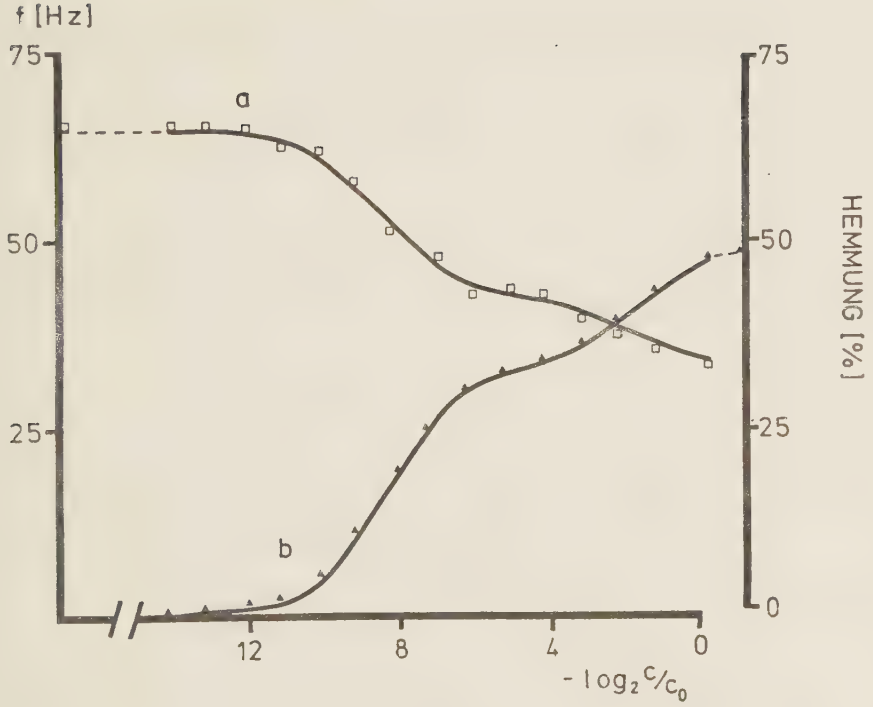



Abb. 34: a: Abhängigkeit der Dopplerfrequenz $f_D$ von der HCG-Konzentration bei konstantgehaltener cPLS-Konzentration.
Versuche in 2o mM Hepes-NaCl-Puffer

b: prozentuale Hemmung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der obigen Proben.

$h_o$ = 632,8 nm ; $\Theta$ = 15° ; E = 5o V/cm
$c_o$: 25o.ooo IE HCG/ml

derselben Ansätze deutlich zwischen HCG-enthaltenden und HCG-freien Urinen unterschieden werden. Bei einem Vorversuch sank die Diffusionskonstante D von HCG-freiem Urin nach Zugabe von 25.000 IE HCG/l um den Faktor 2,8 ab, während sie nach Zugabe derselben Menge physiologischer NaCl-Lösung unverändert blieb.

Gemessen wurden die Ansätze mit einem Ar-Laser bei einer Wellenlänge von $h_o$ = 476,5 nm unter homodynen Bedingungen bei einem Winkel von 30°.

Die besten Streulichtsignale ergaben sich, wenn die Latexteilchen des Gonavislide-Testes 1:4.000 verdünnt wurden.

Für die folgenden Versuchsreihen wurde zunächst männlicher Mittelstrahlurin gewonnen, der zum Ausschluß eines HCG-produzierenden Tumors mit dem Objektträger-Test auf HCG-Freiheit untersucht wurde.

Sechs aliquots dieses Urins à 5 ml wurden bereitgestellt und mit jeweils 1 ml physiologischer NaCl-Lösung, die unterschiedliche Mengen HCG enthielt, so versetzt, daß die Urinproben folgende HCG-Konzentrationen aufwiesen:

| | |
|---|---|
| Probe Nr. 1 | 1.000.000 IE/l |
| Probe Nr. 2 | 100.000 IE/l |
| Probe Nr. 3 | 10.000 IE/l |
| Probe Nr. 4 | 1.000 IE/l |
| Probe Nr. 5 | 100 IE/l |
| Probe Nr. 6 | kein HCG |

Anschließend wurden alle Proben mit 1 n NaOH auf einen pH-Wert von 8,2 gebracht, dann das Urinsediment abzentrifugiert und der Urin außerdem durch einen 0,22 um Millipore-Filter filtriert.

Die so vorbereiteten Urinproben wurden sukzessive 1:2 verdünnt. Als Verdünnungsmedium diente in allen Fällen HCG-freier männlicher Urin.

Jeweils 500 ul jeder Verdünnungsstufe wurden mit 500 ul einer 1:80 mit Urin verdünnten Latexsuspension inkubiert, so daß jeder Ansatz gleiche Mengen AS-beschichteter Latexteilchen enthielt, die im Vergleich zur Gonavislide-Stammlösung 1:4.000 verdünnt war. Die höchsten HCG-Konzentrationen der sechs Verdünnungsreihen betrugen jetzt die Hälfte der o.a. Mengen.

Die Inkubationszeit betrug 12 h bei Zimmertemperatur. Die anschließenden Diffusionsmessungen erfolgten wiederum mit dem Ar-Laser ( $h_o$ = 476,5 nm) unter homodynen Bedingungen in einer runden Meßkuvette mit einem Innendurchmesser von 0,8 cm. Der Meßwinkel betrug $\Theta = 30^{\circ}$.
Abb. 35 zeigt die Änderung der Diffusionskonstanten D in Abhängigkeit von der HCG-Konzentration.

Um die vorangegangenen Versuche in praxi zu überprüfen, wurde der Urin einer schwangeren Frau, die sich in der 10. Schwangerschaftswoche befand, untersucht. Vorbereitung der Proben, Herstellung der Verdünnungsreihe und Diffusionsmessungen erfolgten wie oben beschrieben. Als Standardurin diente ein mit 10.000 IE HCG/l versetzter männlicher Urin. Außerdem wurde eine quantitative Kontrollmessung mit dem Gonavislide-Objektträger-Test durchgeführt, die eine HCG-Konzentration von etwa 70.000 IE HCG/l ergab. Abb. 36 stellt die ermittelten Meßwerte graphisch dar.

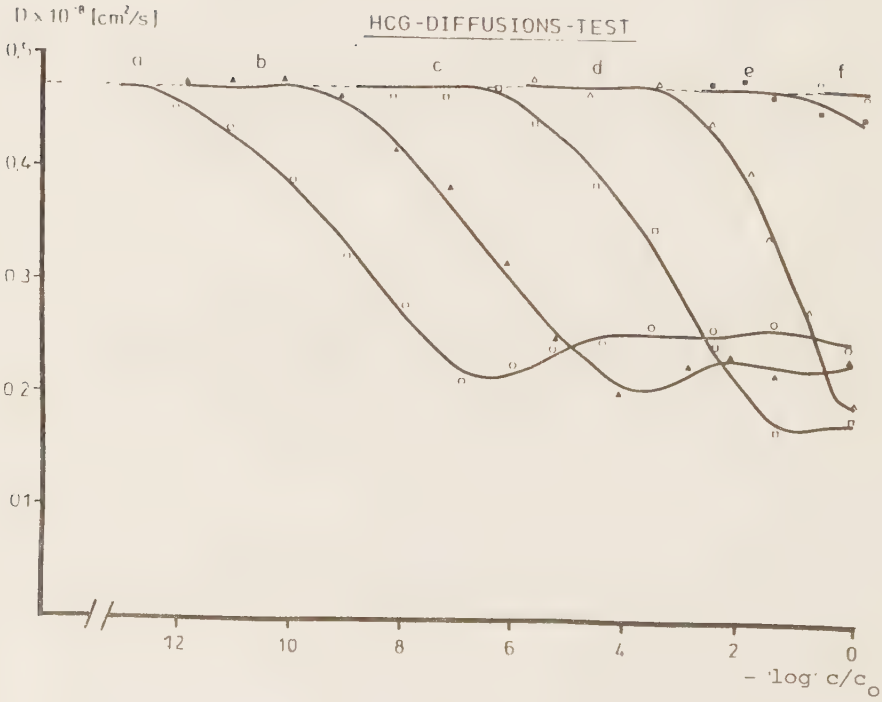



Abb. 35: Abhängigkeit der Diffusionskonstanten D von der HCG-Konzentration verschiedener Urinproben.
$c_o$ stellt den jeweils unverdünnten Urin mit folgenden HCG-Konzentrationen dar:

a: $c_o$: 5oo.ooo IE/l ; b: $c_o$: 5o.ooo IE/l ;
c: $c_o$: 5.ooo IE/l ; d: $c_o$: 5oo IE/l ;
e: $c_o$: 5o IE/l ; f: $c_o$: HCG-freier Urin

Die cPLS-Konzentration lag konstant bei 1:4.ooo der Gonavislide°-Stammlösung.
$h_o$: 476,5 nm ; $\Theta$ = 3o° (weitere Erläuterungen im Text)

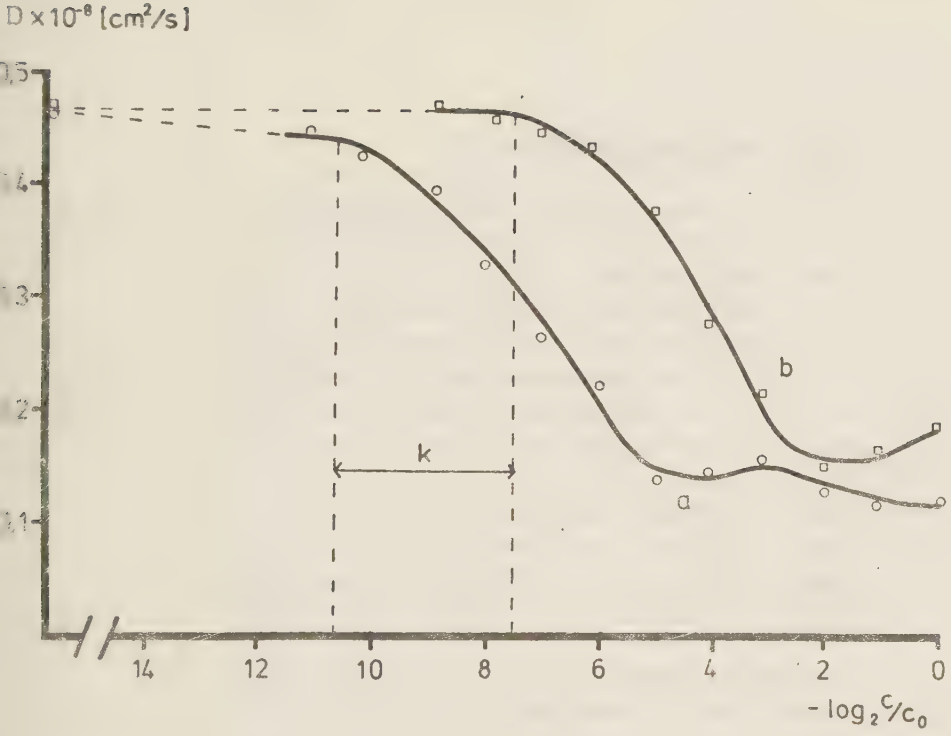



Abb. 36: HCG-Nachweis im Urin einer schwangeren Frau.
Kurve a zeigt die Werte des Urins mit der unbekannten HCG-Konzentration,
Kurve b stellt die Werte eines Standardurins mit 1o.ooo IE HCG/l dar.

Aus dem Abstand beider Kurven, der dem Faktor $k = 2^{3,1} = 8,5$ entspricht, errechnet sich eine HCG-Konzentration von 85.ooo IE HCG/l für die unbekannte Urinprobe.
Die cPLS-Konzentration lag konstant bei 1:4.ooo der Gonavislide$^{o}$-Stammlösung.
$h_o$: 476,5 nm ; $\Theta = 3o^{o}$

### 3.4.4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt, daß die Laser-Doppler-Spektroskopie zum HCG-Nachweis sowohl in verschiedenen Pufferlösungen als auch in Urin möglich ist. Der Vorversuch zum Latex-Elektrophorese-Test (Kap. 3.4.1) verlief positiv. Die Dopplerfrequenz des Streulichtes sank von 43,2 Hz bei den Proben ohne HCG nach Zugabe von 50.000 IE/l auf 23,8 Hz ab, während die Zugabe von physiologischer NaCl-Lösung keine Frequenzverschiebung auslöste (Abb. 31).

HCG-Verdünnungsreihen in verschiedenen Pufferlösungen zeigten eine deutliche Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeiten AS-beschichteter Latexteilchen von der HCG-Konzentration (Abb. 31 bis 34). Alle Kurven haben prinzipiell den gleichen Verlauf. Dabei zeigen die Kurven der Proben mit niedrigern Ionenstärken einen steileren Frequenzabfall als diejenigen mit höheren Ionenstärken. Das bedeutet, daß das Auflösungsvermögen bei niederionalen Lösungen größer ist als bei höherionalen Lösungen. Die Konzentrationsbereiche, in denen HCG-Messungen vorgenommen wurden, lagen zwischen 100 IE/l und 250.000 IE/l. Über den gesamten Meßbereich - wahrscheinlich sogar darüber hinaus - konnte ein kontinuierlicher Frequenzabfall verzeichnet werden. Die Abweichungen vom Mittelwert lagen bei maximal +/- 1,5 Hz. Mit Hilfe einer HCG-Standardlösung konnte mit einer Abweichung von +/- 1/2 Verdünnungsschritt die unbekannte HCG-Konzentration einer gleichionalen Lösung - analog dem Albumin-Immuno-Assay - mit ausreichender Genauigkeit ermittelt werden.
Wie die Abb. 31 bis 34 zeigen, eignen sich alle verwendeten Pufferlösungen einschließlich physiologischer Kochsalzlösung gleichermaßen zur Bestimmung unbekannter HCG-Konzentrationen.

Die Konzentration AS-beschichteter Latexteilchen lag konstant bei 1:600 der im Gonavislide-Test enthaltenen Stammlösung. Die in Kap. 3.4.2 angesprochenen Versuche, die den HCG-Nachweis in Urin mit Hilfe des Elektrophorese-Testes erbringen sollten, führten zu keinem verwertbaren Testverfahren. Urin mit und ohne HCG-Zusatz zeigen annähernd gleiche Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld, die zudem noch mit der Wanderungsgeschwindigkeit AS-beschichteter Latexteilchen übereinstimmt. Trotz deutlich feststellbarer Intensitätsänderung des Streulichts und entsprechender Ergebnisse der Objektträger-Tests konnten keine Frequenzverschiebungen des Laserstreulichtes erreicht werden. Möglicherweise wandern die offensichtlich gebildeten Ag-Ak-Komplexe mit derselben Geschwindigkeit wie die Einzelkomponenten.

Anders sahen die Ergebnisse beim Laser-Diffusions-Test aus. Hier konnte mit den gleichen Ansätzen eine direkte Abhängigkeit der Diffusionskonstanten D von der HCG-Konzentration verschiedener Urinproben nachgewiesen werden: je höher die HCG-Ausgangskonzentration des Urins desto schneller fällt die Diffusionskonstante D auf niedrigere Werte ab (Abb. 35, von links gesehen). Für den Ablauf einer Immunreaktion muß offensichtlich ein bestimmtes Verhältnis Ag zu Ak vorliegen. Je größer nun die ursprüngliche HCG-Konzentration ist, desto eher wird dieses Ag-Ak-Verhältnis erreicht, und um so früher beginnt die Kurve, auf niedrigere Werte abzufallen. Das Verhältnis der Diffusionskonstanten vor und nach der Immunreaktion ergab den Wert 2,5.

Rechnet man bei den Ergebnissen der Abb. 35 die einzelnen Verdünnungsstufen auf absolute HCG-Werte um, so findet man, daß das Absinken der Diffusionskonstanten jeweils zwischen 40 und 70 IE/l beginnt und zwischen 2.200 und 4.000 IE/l endet. Der direkte Meßbereich für diese Präparation lag,

wenn man die Absolutwerte der HCG-Konzentrationen betrachtet zwischen 40 IE/l und 4.000 IE/l, obwohl durch geeignete Verdünnungsreihen auch jede höhere HCG-Konzentration gemessen werden kann.
Die Werte der Abb. 35 für die einzelnen Urinproben lagen bei:

| | | |
|---|---|---|
| Probe Nr. 1 | Kurve a | Meßbereich 60 - 4.000 IE/l |
| Probe Nr. 2 | Kurve b | Meßbereich 70 - 3.500 IE/l |
| Probe Nr. 3 | Kurve c | Meßbereich 50 - 2.200 IE/l |
| Probe Nr. 4 | Kurve d | Meßbereich 40 - 500 IE/l |
| Probe Nr. 5 | Kurve e | Meßbereich nicht sinnvoll anzugeben |

Theoretisch müßte der Abstand der Kurven einem Verdünnungsfaktor von 10 entsprechen, da die Ausgangskonzentrationen der Urinproben sich auch um den Faktor 10 unterschieden. Betrachtet man die oberen Umschlagspunkte, d.h. die Punkte, an denen der Abfall der Diffusionskonstanten beginnt, und vergleicht die Abstände dieser Punkte so ergeben sich die folgenden Werte:

Abstand Kurve a zu Kurve b - $1:2^{3,1}$ = 1:8,6
Abstand Kurve b zu Kurve c - $1:2^{3,2}$ = 1:9,2
Abstand Kurve c zu Kurve d - $1:2^{3,0}$ = 1:9,0
Abstand Kurve d zu Kurve e - $1:2^{2,9}$ = 1:7,7

Diese Ergebnisse bedeuten eine gute Übereinstimmung mit dem theoretisch erwarteten Wert von 1:10.

Wie die Diffusionsmessungen zeigen, lassen sich HCG-Konzentrationen von etwa 50 bis 100 IE/l bis hinaus zu mehreren 100.000 IE/l durch geeignete Verdünnungsreihen bestimmen. Als Referenz dient bei diesen Messungen ein Standardurin mit einer bekannten HCG-Konzentration. Der Abstand beider Verdünnungsreihen ergibt dann den Verdünnungsfaktor, aus dem

die HCG-Konzentration der unbekannten Probe errechnet werden kann als HCG-Konzentration des Standardurins multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor in IE/l. Die Abweichungen der Meßwerte solcher Untersuchungen lagen um +/- 15 % vom erwarteten Wert.

Die Konzentration der AS-beschichteten Teilchen betrug bei den Diffusionsmessungen konstant 1:4.000 der Original-Standardlösung des Gonavislide-Testes, lag also um den Faktor 6,7 niedriger als bei den Elektrophoresemessungen. Das läßt sich erklären durch die höhere Streulichtintensität bei Verwendung des Ar-Lasers gegenüber dem He-Ne-Laser.

Wichtig für den Erfolg der Messungen ist die Inkubation der Proben bei Zimmertemperatur. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Albumin oder Digitoxin konnten nach einer Inkubation im Kühlschrank bei 4°C keine zuverlässigen Ergebnisse mehr erzielt werden. Wahrscheinlich findet beim HCG im Gegensatz zu den anderen Molekülen eine unspezifische Kälteagglutination statt, die auch von anderen Autoren schon beschrieben wurde (45). Weitere Versuche haben gezeigt, daß die Inkubationszeit auf zwei Stunden reduziert werden kann, ohne die Zuverlässigkeit des Testes zu verändern. Diese Inkubationszeit entspricht in etwa derjenigen, die Schulthess et al. in ihrer Arbeit (61) mit 3-4 Stunden abgeben.

Um die Anwendbarbeit des Testes in der Praxis zu bestätigen, wurde der Urin einer schwangeren Frau, die sich in der 10. Schwangerschaftswoche befand, mit dem Diffusions-Test auf HCG untersucht. Der Abstand der Kurve dieses Urins zur Kurve des Standardurins mit 10.000 IE/l betrug etwa 1:8,5

(Abb. 36). Aus diesem Wert errechnet sich eine HCG-Konzentration von 85.000 IE/l. Der als Kontrolle durchgeführte Gonavislide-Objektträger-Test ergab eine HCG-Menge von etwa 70.000 IE/l. Beide Testverfahren zeigen eine gute Übereinstimmung in der Größenordnung der gemessenen HCG-Konzentrationen. Auch andere Autoren, Schulthess et al. (61), berichten über gute Meßergebnisse bei Diffusionsmessungen, sie benutzen allerding einen Inhibitionstest, bei dem die Latexteilchen mit HCG anstelle von Antiserum beschichtet waren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Laser-Doppler-Spektroskopie geeignet erscheint, HCG-Konzentrationen über einen Bereich von 100 IE/l an aufwärts nachzuweisen. Dabei eignet sich der Elektrophorese-Test hervorragend zum HCG-Nachweis in klaren Pufferlösungen, z.B. bei der Kontrolle oder Herstellung von HCG-Präparaten für medizinische oder wissenschaftliche Zwecke, er eignet sich jedoch nicht für den HCG-Nachweis in Urin. Hier wiederum kann der Latex-Diffusions-Test diese Lücke schließen. Mit seiner Hilfe können unbekannte HCG-Konzentrationen im Urin nachgewiesen werden. Auch konnte die HCG-Konzentration einer schwangeren Frau in guter Übereinstimmung mit einem Objektträgertest gemessen werden. Aus der HCG-Konzentration pro Volumeneinheit und der Menge des 24 h-Urins läßt sich dann auch die Tagesausscheidung von HCG berechnen.

Um die Grenzen und Möglichkeiten der oben beschriebenen Testmethoden besser beurteilen zu können, müssen noch umfangreiche Versuchsreihen durchgeführt werden, insbesondere müssen noch Kreuzreaktionen mit anderen Hormonen, die sich allerdings nur bei niedrigen HCG-Konzentrationen bemerkbar machen sollen (44, 45, 61), und weitere Störeinflüsse durch andere Urinbestandteile untersucht werden.

Trotz der Möglichkeit des Schwangerschaftsnachweises durch den Latex-Diffusions-Test muß einschränkend erwähnt werden, daß dieser Test in der gynäkologischen Praxis wahrscheinlich keine Anwendung finden wird, da mit den im Handel befindlichen Objektträger-Tests (Gonavislide °, Pregnosticon °, etc.) eine Schwangerschaft mit über 98 %iger Sicherheit (44; 45) und in bedeutend kürzerer Zeit (2 min. bis 2 h) nachgewiesen werden kann.

## LITERATURVERZEICHNIS


1 Berne, B.J. / Pecora, R.
Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology and Physics
John Wiley and Sons, Inc., New York - London - Sydney - Toronto (1976)

2 Bernhard, G.C. / Cheng, W. / Talmage, D.W.
Journal of Immunology 88, p. 750 (1962)

3 Bio-Rad Protein Assay
Instruction Mannual
Bio-Rad Laboratories GmbH
Dachauer-Str. 364, 8000 München 50 (1979)

4 Bloomfield, V.A. / Lim, T.K.
Quasi-Elastic Laser Light Scattering
Methode in Enzymology 52, 415-494 (1978)

5 Blume, P. / Greenberg, L.J.
Application of Differential Light Scattering to the Latex Agglutination Assay for Rheumatoid Factor
Clinical Chemistry 21, 1234-1237 (1975)

6 Bonner, F.J.
Observation on the Thermal Diffusion of Dextran and Polystryrene
Chemica Scripta 3, 149-152 (1973)

7 Bozdech, V. / Jira, J.
Latex-Agglutinationstest mit dem Toxoplasmaantigen
Deutsches Gesundheitswesen 16, 2398-2400 (1961)

8 Buffone, C.J. / Savory, J. / Croes, P.E. / Hammand, J.E. / Hermans, J.
Evaluation of Kinetic Light Scattering as an Approach to the Measurement of Specific Proteins with the Centrifugal Analyzer
I. Methodology, II. Theoretical Considerations (1975)

9 McCally, R.L. / Bargeron, C.B.
Application of Intensity Correlation Spectroscopy to the Measurement of Continuous Distributions of Spherical Particles
The Journal of Chemical Physics 67, 3151-3156 (1977)

10 Carew, E.B. / Asher, J.M. / Stanley, H.E.
Laser Raman Spectroscopy - New Probe of Myosin Substructure
Science 188, 933-960 (1975)

11 Carlson, F.D.
The Application of Intensity Fluctuation Spectroscopy to Molecular Biology
Annual Review of Biophysics and Bioengeneering 4, 243-264 (1975)

12 Chen, S.-H. / Holz, M.
Medical Application of Photon Correlation Spectroscopy
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass. 02139 (1975)

13 Cheng, C.T. / Persellin, R.H.
Studies with Rabbit IgG-Coated Latex for the Detection of Rheumatoid Factor
Journal of Medicine (Basel) 4, 88,95 (1973)

14 Chu, B.
Laser Light Scattering
Academic Press -New York, San Francisco, London- (1974)

15 Cohen, R. J. / Benedek, G.B.
Immunoassay by Light Scattering Spectroscopy
Immunochemistry 12, 349-351 (1975)

16 Connell, J.J.
Study on the Proteins of Fish Skeletal Muscle
Biochemistry 70, 81-91 (1958)

17 Cummins, H.Z. / Knable, N. / Yeh, Y.
Observation of Diffusion Broadening of Rayleigh Scattered Light
Phys. Res. Letters 12, 150-153 (1964)

18 Cummins, H.Z. / Swinney, H.L.
Light Beating Spectroscopy
Progress in Optic 8, 133-200 (1970)

19 Dezelic, N. / Dezelic, G.
A Photometric Method for the Determination of Serum Titres by Latex Particle Agglutination
Croatica Chemica Acta 42, 457-466 (1970)

20 Dezelic, N. / Petres, J.J. / Dezelic, G.
Preparation of Monodisperse Polystyrene Latices
Kolloid-Z.u.Z. Polymere 242, 1142-1150 (1970)

21 Dezelic, G. / Dezelic, N. / Muic, N. / Pende, B.
Latex Particle Agglutination in the Immunochemical System Human Serum Albumin - Anti-Human Serum Albumin Rabbit Serum
European Journal of Biochemistry 20, 553-560 (1971)

22 Dezelic, G. / Dezelic, N. / Talisman, Z.
The Binding of Human Serum Albumin by Monodisperse Polystyrene Latex Particles
European Journal of Biochemistry 23, 575-581 (1971)

23 Doty, P. / Steiner R.F.
Macro-Ions- I. Light Scattering Theory and Experiments with Bovine Serum Albumin
The Journal of Chemical Physics 20, Nr. 1, 85-94 (1952)

24 Dubin, S.B.
Measurement of Translational and Rotational Diffusion Coefficient by Laser Light Scattering
Methode in Enzymology 26, 119-174 (ed. by Hirs, Timasheff, Academic Press, New York-London (1972)

25 Dumont, F. / Robert, F.
Electrokinetic Properties of Lymphocytes Separated from Mouse
Peyer's Padges
Immunology 33, 295-302 (1977)

26 Ford, N.C., Jr.
Biochemical Application of Laser Rayleigh Scattering
Chemica Scripta 2, 193-206 (1972)

27 French, M.J. /Angus, J.C. / Walton, A.G.
Laser Beat Frequency Spectroscopy
Science 163, No. 3865, 345-351 (1969)

28 Fritz, R.B. / Rives, S.L.
Hepatitis-Associated Antigen Detection by Antibody-Sensitized Latex Particles
The Journal of Immunology 108, 108-111 (1972)

29 Fuerstenau
Adsorption on Carboxylated Polystyrene Latices
The Chemistry of Biosurfaces 1, 173-176 (1971)

30 Fujime, S. / Ishiwata, S.
Dynamic Study of F-Actin Quasielastic Scattering of Laser-Light
Journal of Molecular Biology - New York 62, 251-265 (1971)

31 Fujime, S.
Quasi-Elastic Scattering of Laser-Light
Advances in Biophysics 3, 1-43 (1972)

32 Garvey, M.B. / Black, J.M.
The Detection of Fibrinogen/Fibrin Degradation Products by Means of a New Antibody-Coated Latex Particle
Journal of Clinical Pathology 25, 680-682 (1972)

33 Goodman, M.F.
Laser Sideband Spectroscopy - A Macromolecular Probe
Analytical Biochemistry 51, 97-110 (1973)

34 Hannig, K. / Heidrich, H.G.
Continuous Free-Flow Electrophoresis and its Application in Biology
In: Cell Separation Methods, (H. Bloemendal ed.), part IV; Electrophoretic Methods, Elsevier/North Holland Biomedical Press (1977)

35 Hudson, B.S.
New Laser Techniques for Biophysical Studies
Annual Review of Biophysics and Bioengeneering 6, 135-150 (1977)

36 McIntyre, D. / Gornick, F.
Light Scattering from Dilute Polymer Solutions
Gordon and Breack, New York (1964)

37 Johnson, R.M.
Polystyrene in Binary Solvent Mixtures
Chemica Scripta 1, 81-95 (1971)

38 Kellingsworth, L.M. / Savory, J.
Manual Nephelometric Methods for Immunochemical Determination of Immunoglobulins IgG, IgA, and in Human Serum
Clinical Chemistry 18, 335-339 (1972)

39 Koppel, D.E.
Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy
The Method of Cummulants
J. Chem. Phys. 57, 4814-20 (1972)

40 Kwantes, W. / Payne, R.A. / Ludlam, G.B. / Bridges, J. B. / Fleck, D.G.
Present Day Practice - An Assessment of a Latex Agglutination Slide
Journal of Clinical Pathology 25, 359-360 (1972)

41 Lehninger, A.L.
Biochemie 2. Aufl. 1977
Verlag Chemie (1977)

42 Lim, R.W. / Molday, R.S. / Huang, H.V. / Yen, S.P.
Application of Latex Microspheres in the Isolation of Plasma Membranes - Affinity Density Pertubation of Erythrocyte Membranes
Biochimica et Biophysics Acta 394, 377-387 (1975)

43 Linthicum, D.S. / Sell, S.
Topography of Lymphocyte Surface Immunoglobulin Using Scanning Immunoelectron Microscopy
Journal of Ultrastructure Research 51, 55-68 (1975)

44 Loewit, K. / Philadelphy, V.
Quantitative Choriongonadotropinbestimmung mit einem immunologischen Schwangerschaftstest
Wiener Med. Wochenschrift 6, 107-111 (1965)

45 Loewit, K.
Die immunologischen Schwangerschaftstests
Dtsch. Med. Wschr. 91, 1609-1616 (1966)

46 Mathes, D. / Engelhardt, H.
Schnelle Ausschlußchromatographie von Proteinen
Naturwissenschaften 66, 51-52 (1979)

47 Mohen, R. / Steiner, R / Kaufmann, R.
Laser Doppler Spectroscopy as Applied to Electrophoresis in Protein Solutions
Analytical Biochemistry 70, 506-525 (1976)

48 Morimoto, K. / Harrington, W.F.
Isolation and Composition of Thick Filaments from Rabbit Skeletal Muscle
Journal of Molecular Biology 73, 165-175 (1973)

49 Oreskes, I. / Singer, J.M.
Journal of Immunology 86, 338 (1961)

50 van Oss, C.J. / Singer, J.M.
Res.-J. Reticuloendothel. Soc. 3, 29 (1966)

51 Pecora, R.
Doppler Shifts in Light Scattering from Pure Liquids and Polymer Solutions
J. Chem. Phys. 40, 1604-1614 (1964)

52 Peters, U.
Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Digitoxin und Digoxin bei chronischen Nieren- und Leberer-krankungen
Habilitationsschrift aus der Medizinischen Poliklinik, Klinik A, der Universität Düsseldorf (Prof. Dr. W. Schneider), Moorenstr. 5, 4000 Düsseldorf (1978)

53 Pusey, P.N. / Koppel, D.E. / Schaefer, D.W. / Camerini-Otero, R.D., et al
Intensity Fluctuation Spectroscopie of Laser Light Scattered by Solutions of Spherical Viruses: R17, Qß, BSV, PM2, and T7O
I. Light-Scattering Technique, II. Diffusion Coefficients,
Molecular Biochemistry, 63, 950-970 (1974)

54 Raj, T. / Flygare, W.H.
Diffusion Studies of Bovine Serum Albumin by Quasielastic Light Scattering
Biochemistry 13, 3336-3340 (1974)

55 Rembaum, A.
Microspheres as Immunoreagents for Cell Identification
Cytochemical Methods, Jet Propulsion Laboratory, California Institute of Technology (1978)

56 Sabolovic, D. / Sabolovic, N. / Moutte, A / Leibovici, S. Sauvezis, B. / Chollet, P. / Plagne, R.
Agglutination of Peripheral Blood Lymphocytes from Cancer Patients and not from Healthy Controls, with the F2A1 Histone Fraction
British Journal of Cancer 32, 28-33 (1975)

57 Sabolovic, D.
Analytical Cell-Electrophoresis
Inserm 57, 243-252 (1976)

58 Schaefer, D.W.
Dynamics of Number Fluctuations: Motile Microorganisms
Science 180, 1293-1295 (1973)

59 Schäfer, W.
Diss. Universität Düsseldorf
In Vorbereitung "Reinigung von Myosin aus der Skelet-Muskulatur der Ratte"

60 Singer, J.M. / Oreskes, I. / Hutterer, F. / Ernst, J.
Ann. Rheuma Dis. 22, 424 (1963)

61 Schulthess, G.K. von / Cohen, R.J. / Benedek, G.B.
Laser Light Scattering Spectroscopic Immunoassay in the Agglutination-Inhibition Mode for HCG and Human LH
Immunochemistry 13, 963-966 (1976)

62 Schulthess, G.K. von / Cohen, R. J. / Sakato, N. / Benedek, G.B.
Laser Light Scattering Spectroscopy Immunoassay for Mouse IgA
Immunochemistry 13, 955-962 (1979)

63 Steiner, R.
Experimentelle Untersuchungen zu Einsatzmöglichkeiten der Laser-Doppler-Spektroskopie in biomedizinischer Forschung und klinischer Diagnostik
Habilitationsschrift aus dem Physiologischen Institut, Lehrstuhl für Klinische Physiologie (Prof. Dr. R. Kaufmann) der Universität Düsseldorf, Universitätsstr. 1, 4000 Düsseldorf (1979)

Mittlerweile auch erschienen als Buch:
R. Steiner
Laser-Doppler-Spektroskopie - Experimentelle Untersuchungen zu Einsatzmöglichkeiten in biomedizinischer Forschung und klinischer Diagnostik
Wissenschaftlicher Fachverlag Dr. P. Mannhold, Düsseldorf (1981)

64 Stull, V.R.
Size Distribution of Bacterial Cells
Journal of Bacteriology 109, 1301-1303 (1972)

65 Tagami, Y. / Pecora, R.
Light Scattering from Polydisperse
Rods and Gaussian Coils
I. Integrated Intensities
J. Chem. Phys. 51, 3292-98 (1969)

66 Uzgiris, E.E. / Costaschuk, F.M.
Investigation of Colloid Stability in Polyelectrolyte
Solutions by Laser Doppler Spectroscopy
Nature Physical Science 242, 77-79 (1973)

67 Uzgiris, E.E.
Laser Doppler Spectrometer for Study of
Electrokinetic Phenomena
Review of Scientific Instruments 45, 74-80 (1974)

68 Uzgiris, E.E. / Kaplan, J.H.
Study of Lymphocyte and Erythrocyte Electrophoretic
Mobility by Laser Doppler Spectroscopy
Analytical Biochemistry 60, 455-461 (1974)

69 Uzgiris, E.E.
A Laser Doppler Assay for the Antigen - Antibody
Reaction
Journal of Immunological Methods 10, 85-96 (1976)

70 Ware, B.R.
Electrophoretic Light Scattering
Adv. Colloid Interface Sci. 4, 1-44 (1974)

ABKUERZUNGEN

| | |
|---|---|
| a | Querschnitt des Streuvolumens |
| $A_{(Coh)}$ | Kohärenzfläche |
| $A_{(t)}$ | Amplitude |
| Abb. | Abbildung |
| ACF | Autokorrelationsfunktion |
| Ag | Antigen |
| Ak | Antikörper |
| AS | Antiserum |
| B | Bindungskapazität der Latexteilchen für Proteine |
| BSA | Rinder-Serum-Albumin (bovine serum albumine) |
| c | Konzentration |
| $C_E(\tau)$ | ACF des elektrischen Feldes des Streulichts |
| $C_i(\tau)$ | ACF des Detektorstroms i |
| cPLS | beschichtete Latexteilchen (coated polystyrene latex spheres) |
| d | Durchmesser |
| D | Diffusionskonstante |
| e | Basis des natürlichen Logarhitmus |
| $E_{(t)}$ | elektrisches Feld |
| f | Frequenz |
| $f_D$ | Dopplerfrequenz |
| FFT | fast Fourier Transformation |
| Gl. | Gleichung |
| h | Stunde |
| $h_o$ | Wellenlänge des Laserlichts |
| HCG | menschliches Choriongonadotropin (human chorionic gonadotropin) |
| het | heterodyn |
| homo | homodyn |
| HSA | menschliches Serum-Albumin (human serum albumine) |
| $i_{(t)}$ | Detektorstrom |
| I | Ionenstärke |
| IE | internationale Einheit |

| | |
|---|---|
| I.P. | isoelektrischer Punkt |
| $\bar{K}$ | Wellenvektor des Streulichts |
| L | Länge des Streuvolumens |
| LDS | Laser-Doppler-Spektroskopie |
| ln | natürlicher Logarhitmus |
| MG | Molekulargewicht |
| n | Brechungsindex |
| $N_A$ | Avogadro'sche Zahl: 6,o2295 x $1o^{23}$ Moleküle/Mol |
| O | Oberfläche der Latexteilchen |
| part./ml | Anzahl der Latexteilchen pro ml |
| PLS | Latexteilchen (polystyrene latex spheres) |
| PS | "power"-Spektrum |
| R | Abstand zwischen Streuvolumen und Detektorfläche |
| $S_i(\omega)$ | "power"-Spektrum des elektrischen Feldes des Streulichts |
| $S_i(\nu)$ | "power"-Spektrum des Detektorstroms i |
| t | Zeit |
| Tab. | Tabelle |
| $\bar{v}$ | elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit |

| | |
|---|---|
| $\gamma$ | Quantenausbeute des Photomultipliers |
| $\theta$ | Winkel, unter dem das Streulicht gemessen wird |
| $\mu$ | Mobilität, elektrophoretische Beweglichkeit |
| $\tau_A$ | Halbwertsbreite der ACF |
| $\tau_c$ | Relaxationszeit oder Korrelationszeit, Abfall der Amplitude auf 1/e |
| $\omega$ | Kreisfrequenz |
| $\Omega_{Coh}$ | Kohärenz-Raumwinkel |

LEBENSLAUF

Persönliche Daten

| | |
|---|---|
| Name: | Stefan Holzmann |
| Wohnort: | 4ooo Düsseldorf |
| Geburtsort: | 6ooo Frankfurt am Main |
| Geburtsdatum: | 15. Mai 1954 |

Ausbildung

Schulen:

April 1961 - April 1965 Grundschule
Mai 1965 - Mai 1973 Gymnasium

14. Mai 1973 Abitur

Studium:

Universität Düsseldorf

WS 1973 - SS 1974 Physik
SS 1974 - WS 198o Humanmedizin

1. April 1978 - 31. Aug. 198o

studentische Hilfskraft am Institut für Klinische Physiologie der Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)

5. Nov. 198o Dritter und letzter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

18.Nov. 198o Approbation als Arzt

ab SS 1981 nebenberufliches Zweitstudium in den Fächern Philosophie und Spanisch

Beruf

2. Jan. 1981 - 31. Okt. 1981

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Klinische Physiologie der Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)

1. Nov. 1981 - 31. Juli 1982

Assistenzarzt für Anästhesiologie am Marienhospital in Düsseldorf (Chefarzt Dr. M. Otten)

1. Aug. 1982 - 3o. Sept. 1982

Fertigstellung der Dissertation

ab 1. Okt. 1982

Assistenzarzt an der Radiologischen Abteilung des Ev. Krankenhauses in Düsseldorf (Chefarzt Dr. H. Hornig)

ab Okt. 1983 ist ein Wechsel in die Abteilung für Innere Medizin des Ev. Krankenhauses in Düsseldorf geplant (Chefarzt Prof. Dr. W. Herms).